

Institut für Genetik der Justus-Liebig-Universität Gießen

Epigenetische Untersuchung von Tumorsuppressorgen und deren Regulation durch CTCF

*Epigenetic analysis of tumor suppressor genes and their
regulation by CTCF*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

M. Sc. Tanja Haag

geb. am 24.08.1982 in Siegen

Gießen 2014

Angefertigt am Institut für Genetik des Fachbereichs 08 (Biologie und Chemie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann

2. Gutachterin: Prof. Dr. Tina Trenczek

**Epigenetische Untersuchung
von Tumorsuppressorgenen und deren
Regulation durch CTCF**

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Journalen veröffentlicht:

Richter, A.M., Haag, T., Walesch, S., Herrmann-Trost, P., Marsch, W.C., Kutzner, H., Helmbold, P., Dammann, R.H. (2013). **Aberrant promoter hypermethylation of RASSF family members in merkel cell carcinoma.** *Cancers (Basel)* 5(4):1566-76.

Haag, T., Herkt, C., Walesch, S., Richter, A.M., Dammann, R.H. (2014). **The *apoptosis associated tyrosine kinase* is frequently hypermethylated in human cancer and regulated by epigenetic mechanisms.** *Genes & Cancer* 5: 365-74.

Haag, T., Dammann, R.H. (in Vorbereitung). **CTCF induced reexpression of the *dual specificity phosphatase 2 (DUSP2)* is linked with decreased 5hmC levels at the *DUSP2* promotor.**

Während der Promotion entstandene Publikation, deren Ergebnisse nicht in die vorliegende Arbeit einbezogen wurden:

*Dammann, G., *Teschler, S., *Haag, T., *Altmüller, F., Tuczec, F., Dammann, R.H. (2011). Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder. *Epigenetics*. Dec; 6(12):1454-62. (*The authors contributed equally to this work)

Die Ergebnisse wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

Cell Symposia “Cancer Epigenomics”; Sitges, Spain 10/2013

Impact of CTCF on the epigenetic regulation of the tumor suppressor gene *DUSP2*.
Haag, T., Dammann, R.H.

ECCPS/PVRI Symposium “Molecular Mechanisms and Treatment of Heart; Bad Nauheim/ Germany 01/2014

The *apoptosis associated tyrosine kinase* gene (*AATK*) is frequently hypermethylated in lung cancer and regulated by epigenetic mechanisms.

Haag, T., Herkt, C., Dammann, R.H.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung / Abstract	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract.....	2
2 Einleitung	3
2.1 Allgemeine Karzinogenese	3
2.2 Epigenetische Genregulation.....	4
2.3 Tet-Protein- vermittelte 5-Methylcytosin-Oxidation	5
2.4 CCCTC <i>Binding Factor</i> (CTCF)	7
2.4.1 Der paraloge Faktor BORIS	10
2.5 Untersuchte Kandidatengene	11
2.5.1 <i>Apoptosis-associated tyrosine kinase</i> (AATK).....	11
2.5.2 <i>Dual-specificity phosphatases</i> (DUSPs).....	12
2.5.3 <i>Ras-Association Domain-Family</i> (RASSF)	14
2.6 Zielsetzung der Arbeit	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Chemikalien.....	17
3.1.2 Längenstandards/ Molekulargewichtsstandard	19
3.1.3 Antibiotika für die Kultivierung von humanen Zellen.....	19
3.1.4 Antibiotika für <i>E.coli</i>	19
3.1.5 Zellkulturmedien	20
3.1.6 Zusätze für die Zellkultur	20
3.1.7 Chemikalien im Einsatz in der Zellkultur.....	20
3.1.8 Transfektionsreagenzien	20
3.1.9 Lösungen und Puffer	21
3.1.10 Medien.....	28
3.1.11 Medienzusätze	29
3.1.12 Enzyme.....	30
3.1.13 Primer	31

3.1.14	Verwendete siRNA	36
3.1.15	Antikörper	36
3.1.16	Vektoren	37
3.1.17	Chemokompetente <i>Escherichia coli</i> -Stämme (<i>E. coli</i>)	39
3.1.18	Humane Zelllinien.....	39
3.1.19	Primäre Tumore.....	41
3.1.20	Vorgefertigte Systeme (Kits).....	42
3.1.21	Gebrauchswaren	43
3.1.22	Geräte.....	43
3.1.23	Verwendete Software / Datenbanken	45
3.1.24	Sterilisation / Autoklavierung von Lösungen und Gebrauchswaren	46
3.2	Methoden	46
3.2.1	Arbeiten mit humanen Zellen.....	46
3.2.2	<i>Colony Formation Assay</i>	51
3.2.3	Präparation von DNA und RNA	51
3.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
3.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	53
3.2.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	53
3.2.7	Methylierungsanalysen.....	54
3.2.8	RNA-Expressionsanalyse.....	64
3.2.9	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	67
3.2.10	Nachweis von Proteinen.....	69
3.2.11	Luciferaseassay.....	71
3.2.12	Arbeiten mit <i>E. coli</i> / Klonierung	72
4	Ergebnisse	77
4.1	Promotor-Methylierungsstatus der Gene <i>AATK</i> , <i>DUSP2</i> , <i>RASSF5A</i> und <i>RASSF5C</i>	77
4.1.1	Methylierungsstatus von <i>AATK</i> in humanen Zelllinien	77
4.1.2	Promotormethylierungsstatus von <i>DUSP2</i> in humanen Zelllinien	80
4.1.3	Promotormethylierungsstatus von <i>RASSF5A</i> und <i>RASSF5C</i> in humanen Zelllinien	82
4.1.4	Zusammenfassung der Methylierungsanalyse der Gene <i>AATK</i> , <i>DUSP2</i> , <i>RASSF5A</i> , <i>RASS5C</i> und <i>RASSF2</i> in humanen Zelllinien.....	83
4.1.5	Methylierungsstatus von <i>AATK</i> , <i>DUSP2</i> , <i>RASSF5A</i> und <i>RASSF5C</i> in Primärtumoren unterschiedlicher Krebsentitäten	85

4.2	Analyse des Einflusses der Promotor-Methylierung von <i>AATK</i> , <i>DUSP2</i> , <i>RASSF5A</i> und <i>RASSF5C</i> auf die RNA-Expression	87
4.3	Einfluss von <i>AATK</i> und <i>RASSF5C</i> auf die Kolonieformation in Krebszelllinien	88
4.4	Einfluss von CTCF auf <i>DUSP2</i> , <i>AATK</i> und Mitglieder der <i>RASSF</i> -Familie	89
4.4.1	Einfluss transienter CTCF-Überexpression auf die RNA-Expression von <i>DUSP2</i> , <i>AATK</i> und Mitglieder der <i>RASSF</i> -Familie.....	90
4.4.2	Einfluss transienter Überexpression einzelner CTCF-Domänen sowie von CTCF-Modifikationen auf die RNA-Expression von <i>DUSP2</i> , <i>AATK</i> und <i>RASSF5C</i>	92
4.4.3	Einfluss transienter Überexpression von <i>full length</i> CTCF, einzelner CTCF-Domänen sowie von CTCF-Modifikationen auf die Promotor-Methylierung von <i>DUSP2</i> , <i>AATK</i> und <i>RASSF5C</i>	96
4.4.4	Auswirkung der Depletion von CTCF auf die RNA-Expression von <i>AATK</i> , <i>DUSP2</i> und <i>RASSF5C</i> sowie auf die <i>DUSP2</i> -Promotormethylierung	99
4.4.5	Einfluss von CTCF in stabil induzierbaren TREx293-chCTCF-Zellklonen auf die <i>AATK</i> - und <i>DUSP2</i> -RNA-Expression	101
4.4.6	Analyse der CTCF-Bindung an den <i>AATK</i> -, <i>DUSP2</i> - und <i>RASSF5C</i> -Promotor	102
4.4.7	Analyse des Einflusses von CTCF auf den <i>DUSP2</i> -Promotor <i>in vitro</i>	106
4.4.8	Einfluss von CTCF auf die Hydroxymethylierung am <i>DUSP2</i> -Promotor	109
4.5	Einfluss des CTCF-Paralogs BORIS (CTCFL) auf die RNA-Expression von <i>AATK</i> - und <i>DUSP2</i> sowie auf die <i>DUSP2</i> -Promotormethylierung	114
4.6	Einfluss von CTCF auf die RNA-Expression von <i>TET1</i> , <i>TET2</i> und <i>TET3</i>	116
4.7	Genomweite Analyse der 5mC- und 5hmC-Level und RNA-Expressionsänderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen sowie RNA-Expressionsänderungen nach transienter BORIS-Überexpression in HEK-Zellen	118
4.7.1	Genomweite Änderungen der Gesamt- und Hydroxymethylierung nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen.....	118
4.7.2	Genomweite Expressionsänderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen sowie RNA-Expressionsänderungen nach transienter BORIS-Überexpression in HEK-Zellen	121
4.7.3	Zusammenfassung der genomweiten Methylierungs-und Expressionsanalysen	125
4.8	Verifikation ausgewählter Ergebnisse des <i>Affimetrix human ST1.0S Arrays</i>	125
5	DISKUSSION	127

5.1	Hypermethylierung von <i>AATK</i> , <i>DUSP2</i> , <i>RASSF5A</i> und <i>RASSF5C</i> in humanen Krebszelllinien und Primärtumoren sowie tumorsuppressive Eigenschaft von <i>AATK</i>	127
5.2	CTCF führt methylierungsabhängig zur Reexpression von <i>AATK</i> , <i>DUSP2</i> und <i>RASSF5C</i>	132
5.3	Keine Bestätigung der aktivierenden Wirkung von CTCF auf den <i>DUSP2</i> -Promotor mittels Luciferaseassay	134
5.4	Methylierungsabhängige Bindung von CTCF an den <i>DUSP2</i> -, <i>AATK</i> - und <i>RASSF5C</i> -Promotor	135
5.5	Schwache Demethylierung des <i>AATK</i> - und <i>DUSP2</i> -Promotors in Folge einer CTCF-Überexpression	135
5.6	Abnahme der Hydroxymethylierung am Promotor von <i>DUSP2</i> und weiteren tumorassoziierten Genen in Folge einer CTCF-Überexpression / CTCF-Induktion.	136
5.7	BORIS induziert im Gegensatz zu seinem Paralog CTCF nicht die Induktion von <i>AATK</i> und <i>DUSP2</i>	140
5.8	Genomweit wird ein geringer Anteil an Genen von CTCF und BORIS dereguliert..	141
5.9	Ausblick.....	142
6	Anhang	144
6.1	Ergänzung zur Methylierungsanalyse von <i>RASSF2</i> und vollständige Ergebnisse der Methylierungsanalyse von <i>DUSP2</i> und <i>RASSF5</i> in Primärtumoren.....	144
6.2	Einfluss von CTCF in dem stabil induzierbaren TReX293-chCTCF-Zellklon A2 auf die <i>AATK</i> -, <i>DUSP2</i> - und <i>TET1-3</i> RNA-Expression	147
6.3	Ergänzung zum Einfluss einzelner CTCF-Domänen auf die RNA-Expression von <i>DUSP2</i> und <i>AATK</i>	147
6.4	Ausschnitte durchgeführter Sequenzierungen.....	148
6.5	PhD Portfolio des Graduiertenkollegs MGK.....	150
7	Literaturverzeichnis	154
8	Eidesstattliche Erklärung	168
9	Danksagung	169

Abkürzungsverzeichnis

α	griech.: <i>alpha</i>
A	Adenin
AATK	<i>apoptosis associated tyrosine kinase</i>
3-ABA	3-Aminobenzamid
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
<i>ad</i>	zufügen (lat.: zu)
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-triphosphat / Adenosinphosphosulfat in Zusammenhang mit Pyrosequenzierung
5-Aza-dC	5-Aza-2'-deoxycytidin
β	griech.: <i>beta</i>
β -Gal	β -Galaktosidase
β -GT	β -Glycosyltransferase
bp	Basenpaare
Bs	Bisulfit-behandelt
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CAM	Chloramphenicol
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	„copy“ („complementary“) DNA

ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CMV	humanes Cytomegalie Virus, Promotorregionen für virale RNA Polymerasen
COBRA	<i>Combined Bisulfite-Restriction-Analysis</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Dinukleotid
chCTCF	<i>chicken CTCF</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
CTCF-C	C-Terminus von <i>CTCF</i>
CTCFL	<i>CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like</i> (BORIS)
CTCF-N	N-Terminus von <i>CTCF</i>
d	Tag(e)
Δ	griech.: <i>delta</i> steht für Deletion bzw. Symbol verwendet bei Mutation (PARylierungs- und SUMOylierungsstellen)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dtsch.	deutsch
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DUSP2	<i>dual specificity phosphatase 2</i>

ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Endkonz.	Endkonzentration
<i>et al.</i>	<i>et alterae</i> (und andere)
EthBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EtOH _{DEPC}	Ethanol mit H ₂ O _{DEPC} verdünnt
FA	Formamid
FastAP	thermosensitive Alkaline Phosphatase
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
fw	<i>forward</i> (dtsch.: vorwärts bei Primerrichtung)
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
griech.	griechisch
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HEK	HEK293T-Zellen
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	lat. „im Glas“, nicht in einem lebenden Organismus

<i>in vivo</i>	lat. „im Lebendigen“, im lebenden Organismus
IP	Immunopräzipitation
<i>i.v.m.</i>	<i>in vitro</i> methyliert
Kan.	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium)
LiCl	Lithiumchlorid
Lsg.	Lösung
μ	Mikro-
m	Milli-
M	Molar
max.	maximal
MCC	<i>Merkel cell carcinoma</i> (dtisch. Merkelzell-Karzinom)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MeDIP	<i>Methylated DNA Immunoprecipitation</i>
methyl.	methyliert
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
ml	Milliliter
MMLV-RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
mol	Stoffmenge (6×10^{23} Teilchen)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	nano
N	standardisiertes IUPAC Symbol für <i>any</i> (alle Nukleotide möglich: G,A,C oder T)

na	nicht analysiert
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄	Ammonium
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
Nr.	Nummer
NZY	NZ Amine <i>yeast extract</i>
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
p	p-Wert: Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Paryl.	PARylierung(ssstelle)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin (Transfektionsreagenz)
Pen.	Penicillin
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PPi	Pyrophosphat
PS	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
R	standardisiertes IUPAC Symbol für Purine (Adenin oder Guanin)
RASSF	<i>Ras association family member</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase A	Ribonuklease A
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
rv	<i>reverse</i> (dtsch.: rückwärts; bei Primerrichtung)
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> (dtsch.: kleinzelliger Lungenkrebs)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> (dtsch.: Natriumdodecylsulfat)
sec.	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
Strep.	Streptomycin
SUMO	SUMOylierung(ssstelle)
SV40	<i>Simian virus 40</i> (dtsch.: Affenvirus 40)
t	Zeit
T	Thymin
T3,T7	Promotorregionen für virale RNA Polymerasen (als Sequenzierprimer verwendet)
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
Tab.	Tabelle
TAB-Seq	<i>Tet-assisted bisulfite sequencing</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur

<i>TET</i>	<i>Ten-Eleven Translocation</i>
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSG	Tumorsuppressorgen
TS / TSS	Transkriptionsstart
U	Uracil
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
unmethyl.	unmethyliert
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
verg.	vergällt
Vol.	Volumen
vs.	<i>versus</i> (im Vergleich zu)
VT	Volumenteil
V/V	Volumenanteile (<i>volume per volume</i>)
Y	standardisiertes IUPAC Symbol für Pyrimidine (Cytosin oder Thymin)
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des multifunktionalen Transkriptionsfaktors CTCF (*CCCTC-Binding Factor*) auf ausgewählte Tumorsuppressorgene untersucht. In die Analyse einbezogen wurden neben Mitgliedern der *RASSF* (*Ras-Association domain family*)-Familie, die Gene *AATK* (*Apoptosis-associated tyrosine kinase*) und *DUSP2* (*Dual-specificity phosphatase 2*), die im Rahmen einer Transkriptomanalyse in Folge eines CTCF-*Knockdowns* in HeLa-Zellen eine signifikante Deregulation aufwiesen sowie tumorassoziiert sind und CTCF-Bindestellen besitzen. Die Charakterisierung der Kandidaten hinsichtlich epigenetischer Parameter ergab, dass eine Promotorhypermethylierung von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* sowie *RASSF5C* in verschiedenen Krebszelllinien mit einer reduzierten RNA-Expression korreliert. Eine Hypermethylierung der Promotoregion von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* sowie *RASSF5C* konnte zudem in primären Tumoren unterschiedlicher Krebsentitäten erfasst werden. Für *AATK* wurde mittels *Colony Formation Assays* eine tumorsuppressorische Wirkung nachgewiesen. Transiente CTCF-Überexpression führte zur methylierungsabhängigen Änderung der *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*-RNA-Expression; d.h. eine Reexpression der Gene nach CTCF-Überexpression wurde nur bei Vorlage eines methylierten Promotors beobachtet. Die Überexpression der N-terminalen Domäne von CTCF resultierte in der stärksten Steigerung der *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C*-Expression. Weiterhin führte die Mutation der CTCF-SUMOylierungsstellen und die Deletion der CTCF-PARYlierungsstelle in Zellen mit methyliertem *AATK* bzw. *DUSP2*-Promotor zu inhibierter *AATK* bzw. *DUSP2*-RNA-Expression. Der Einfluss der SUMOylierung konnte ferner durch SUMO-Überexpressions-Experimente verifiziert werden. Die Depletion von CTCF führte in Zellen mit schwacher oder partieller Promotormethylierung von *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C* zu reduzierter RNA-Expression des jeweiligen Gens, nicht aber zur signifikanten Änderung der Promotormethylierung. Das gezielte Einschalten von CTCF in einem stabilen System wurde durch Herstellung einer modifizierten HEK293-Zelllinie ermöglicht, die tetrazyklinabhängig CTCF exprimiert. Auch in dieser Zelllinie konnte die Reexpression von *DUSP2* nach CTCF-Induktion beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CTCF methylierungsabhängig an den *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*-Promotor bindet. Zudem konnte sowohl nach transients CTCF-Überexpression, als auch nach CTCF-Induktion in den modifizierten HEK293-Zellen eine signifikante Abnahme der Hydroxymethylierung (5hmC) am methylierten *DUSP2*-Promotor detektiert werden. Das CTCF-Paralog BORIS hatte keine Auswirkung auf die RNA-Expression oder Methylierung der Kandidatengene. Durchgeführte Genomweite Methylierungs- und Expressionsanalysen wiesen ebenfalls daraufhin, dass CTCF die Hydroxymethylierung beeinflusst und konnten zur Identifikation neuer tumorassoziiierter Kandidatengene beitragen, die in Folge einer CTCF-Expression eine epigenetische Aktivierung aufwiesen. In weiteren funktionellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TET1 in den Mechanismus der Regulation von *DUSP2* über CTCF involviert ist. Insgesamt konnten in dieser Arbeit originäre epigenetische Regulationsmechanismen ausgewählter Tumorsuppressorgene durch CTCF beschrieben werden.

1.2 Abstract

In the present work, the influence of the multifunctional transcription factor CTCF (CCCTC-binding factor) was examined for selected tumor suppressor genes. The analysis included, besides members of the *RASSF* family (*Ras association domain family*), the genes *AATK* (*apoptosis associated tyrosine kinase*) and *DUSP2* (*dual specificity phosphatase 2*), which showed in a transcriptome analysis in HeLa cells a significant deregulation in consequence of a CTCF-knockdown. Further *AATK* and *DUSP2* are tumor associated and harbor CTCF-binding sites. The characterization of the candidates concerning epigenetic parameters revealed that a promoter hypermethylation of *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* and *RASSF5C* is correlated with reduced RNA expression in various cancer cell lines. A hypermethylation of the *AATK*-, *DUSP2*-, *RASSF5A*- and *RASSF5C* promoter region could also be detected in primary tumors of different cancer entities. A tumorsuppressive effect was detected for *AATK* by colony formation assays. Transient CTCF overexpression altered the RNA expression of *AATK*, *DUSP2* and *RASSF5C*, dependent on the promoter methylation status, meaning a re-expression of genes after CTCF overexpression was observed only in the case of a methylated promoter. Overexpression of the N-terminal domain of CTCF led to the strongest increase of the *AATK*, *DUSP2* and *RASSF5C* expression. Further mutation of the CTCF SUMOylation sites and deletion of the CTCF PARylation site in cells with methylated *AATK* or *DUSP2* promoter inhibited both, the *AATK* and *DUSP2* RNA expression. The influence of SUMOylation was verified by SUMO-overexpression experiments. The depletion of CTCF in cells with weak or partial promoter methylation of *AATK*, *DUSP2* or *RASSF5C* resulted in reduced RNA expression of each gene, but not in significantly altered promoter methylation. To specifically switch on the CTCF-expression in a stable system, a modified HEK293 cell line was created, that expresses CTCF tetracycline depended. Also in this cell line, the re-expression of *DUSP2* after CTCF induction was observed. Furthermore, it was shown that CTCF binds methylation dependent to the *AATK*, *DUSP2* and *RASSF5C* promoter. Moreover a significant decrease in the hydroxymethylation (5hmC) at the methylated *DUSP2* promoter after transient CTCF overexpression, as well as after CTCF induction in the modified HEK293 cells was detected. The CTCF paralog BORIS had no effect on RNA expression or methylation of candidate genes. Genome-wide methylation and expression analysis also pointed out, that CTCF affects the hydroxymethylation and could contribute to the identification of new tumor-associated candidate genes, that showed an epigenetic activation as a result of CTCF expression. In further functional studies it has been shown that TET1 is involved in the mechanism of regulation of *DUSP2* via CTCF. Overall distinct epigenetic regulatory mechanisms of selected tumor suppressor genes by CTCF could be described in this work.

2 Einleitung

Weltweit sterben jedes Jahr etwa 7,9 Millionen Menschen an Krebs, mehr als 11 Millionen erkranken jährlich neu (Nationales Genomforschungsnetz, 2014). Aufgrund der demographischen Entwicklung ist davon auszugehen, dass die Zahl der Krebserkrankungen bis zum Jahr 2030 auf 16 Millionen Menschen weltweit ansteigen wird (Nationales Genomforschungsnetz, 2014). Entstehung und Verlauf von Krebserkrankungen sind auf genetische sowie epigenetische Veränderungen in den für die jeweilige Krebsentität spezifischen Körperzellen zurückzuführen, die daraufhin zu Tumorzellen entarten. Die Krebsforschung arbeitet weltweit intensiv an der Identifizierung und Charakterisierung von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen sowie den zugrundeliegenden molekularen Signalwegen. Das Verständnis der molekularen Zusammenhänge bei der Krebsentstehung lieferte bereits essentielle Grundlagen für die Entwicklung neuartiger Therapeutika für die Behandlung einzelner Krebserkrankungen (Nationales Genomforschungsnetz, 2014). Dennoch bedarf es weiterer Forschungsanstrengungen, um die molekularen Mechanismen der Karzinogenese vollends aufzudecken und damit den Weg für effektive Therapien frei zu machen.

2.1 Allgemeine Karzinogenese

Die Karzinogenese (Tumorentwicklung) ist der äußerst komplexe und zum Teil noch unverstandene Prozess der Krebsentstehung. Die Erkrankung Krebs beschreibt eine bösartige Gewebeneubildung (maligne Neoplasie). Ein gesunder Organismus hält die Bildung und Regeneration der Zelltypen, aus denen sich die verschiedenen Gewebe und Organe aufbauen, in einem ausgewogenen, artspezifischen Gleichgewicht (Homöostase). Im Zustand der Homöostase herrscht ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod. Die Apoptose, d.h. der programmierte Zelltod nimmt beim Absterben der Zellen den Großteil ein, wobei in pathologischen Situationen auch die Nekrose eintreten kann. Im Falle einer Krebserkrankung verändert sich das Gleichgewicht zu Gunsten des Zellwachstums. Es kommt zum unkontrollierten Zellwachstum, da inhibierende Signale nicht erkannt oder nicht ausgeführt werden können. Der Grund für diese gestörte zelluläre Programmierung liegt in genetischen und epigenetischen Veränderungen (Nationales Genomforschungsnetz, 2014). Zu den genetischen Ursachen gehören Punktmutationen, Deletionen, Duplikationen, Insertionen und Translokationen ebenso wie Chromosomenaberrationen und Virusinfektionen (zur Hausen *et al.*, 1975). Diese Faktoren nehmen Einfluss auf die DNA-Sequenz und verändern damit die Funktion und Regulation der entstandenen Genprodukte oder führen zum vollständigen Funktionsverlust. Dabei haben Onkogene und Tumorsuppressorgene eine tragende Rolle. Protoonkogene sind zuständig für die Zellteilung, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Werden Protoonkogene bedingt durch eine Mutation so verändert, dass sie ihre normalen Funktionen nicht mehr korrekt ausführen können und nicht mehr auf normale zelluläre Signale reagieren, was in der Summe zu unkontrolliertem Tumorwachstum führt, werden sie als Onkogene bezeichnet. Tumorsuppressorgene überwachen die korrekte Abfolge der Basenpaare in der DNA nach jeder Reduplikation, entscheiden über die Notwendigkeit von Reparaturvorgängen, halten den

Zellzyklus an, bis die Reparaturen ausgeführt sind und veranlassen gegebenenfalls die Apoptose, sofern die Reparatur erfolglos war. Verlieren Tumorsuppressorgene ihre Funktion, bleiben entartete Zellen unerkannt, können sich teilen und damit Mutationen auf die Tochterzellen übertragen, was zur Anhäufung von Mutationen in nachfolgenden Zellteilungen führen kann (Nationales Genomforschungsnetz, 2014). Nach der *two hit hypothesis* von Knudson (1971), müssen beide Allele eines Tumorsuppressorgens von einer Mutation betroffen sein, damit die Funktion und Regulation des Gens beeinträchtigt bzw. inaktiviert wird. Dementsprechend genügt der Funktionsverlust nur eines Allels nicht, um die Funktion eines Tumorsuppressorgens vollständig zu eliminieren.

Den Tumorsuppressorgen wird eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von malignen Neoplasien zugesprochen. Wird ein Onkogen aktiviert, entsteht nicht zwangsläufig Krebs, solange Tumorsuppressorgene aktiv sind und derart mutierte Zellen in Apoptose schicken. Allerdings führt eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgen bei gleichzeitiger Aktivierung eines Onkogens zur Ausbildung von Tumoren (Nationales Genomforschungsnetz, 2014). Die Behandlung von Krebserkrankungen wird zusätzlich dadurch erschwert, dass die entarteten Zellen weitere Fähigkeiten gewinnen, wie unter Hypoxie (Sauerstoffmangel) zu überleben, eine eigene Blutversorgung aufzubauen (Angiogenese) oder aus dem Zellverband auszuwandern und sich in fremden Geweben anzusiedeln (Metastasierung). Erst durch diese Fähigkeiten erlangt der Krebs seine tödliche Potenz. 90% aller Krebspatienten, bei denen die Erkrankung tödlich verläuft, sterben nicht am Primärtumor, sondern an den Folgekrankheiten der Metastasierung (Nationales Genomforschungsnetz, 2014).

2.2 Epigenetische Genregulation

Die Regulation von Tumorsuppressorgen kann unter anderem über epigenetische Mechanismen erfolgen. Die Epigenetik befasst sich im Allgemeinen mit der Vererbung von Merkmalen, die nicht durch die kodierende DNA-Sequenz an sich festgelegt sind (Jones & Baylin, 2007). Epigenetische Inaktivierungen können durch zwei Mechanismen herbeigeführt werden. Beim ersten Mechanismus handelt es sich um die Umstrukturierung des Chromatins. Die Inaktivierung mittels Chromatinveränderung erfolgt dadurch, dass das Chromatin, in dem das betroffene Gen liegt, von aktivem Euchromatin zu inaktivem Heterochromatin umstrukturiert wird. Der zweite epigenetische Mechanismus, der zur Inhibierung der Genaktivität führt, ist die Promotor-Hypermethylierung von Genen. In Säugern erfolgt die Methylierung am Cytosin im CpG-Kontext. Diese CpG-Nukleotide kommen in etwa der Hälfte aller Gene in einem Bereich von 0,5-2 kb um den Transkriptionsstart, einschließlich des basalen Promotors, gehäuft vor und werden daher als CpG-Inseln bezeichnet (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Bei der Methylierung kommt es zur Bindung einer Methylgruppe an das C-Atom in Position 5 des Cytosins. Katalysiert wird dieser Vorgang durch die DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Die DNMT1 dient dabei der Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus in somatischen Zellen während der Zellproliferation (Bestor, 2000), wobei das Methylierungsmuster des Elternstranges auf den Tochterstrang übertragen werden muss. Die DNMT3a und die DNMT3b sorgen für die *de novo*-Methylierung (Bestor, 2000), d.h. sie sind für die Neumethylierung der unmethylierten DNA zuständig. Ein weiterer essentieller Faktor der DNA-Methylierung ist das Vorhandensein des Methylgruppendonors S-Adenosyl-methionin (SAM) (Loenen, 2006).

SAM wird aus der Aminosäure Methionin synthetisiert und während der Methylierung zu S-Adenosyl-Homocystein umgesetzt.

Die Repression der Transkription durch die DNA-Methylierung kann auf zwei Wegen erzielt werden. Zum Einen wird durch die Methylgruppen die Erkennung der DNA durch Transkriptionsfaktoren verhindert, zum Anderen kommt es infolge der Methylierung zur Bindung verschiedener methylierungsspezifischer Proteine wie MeCP2 (Methyl-CpG-Bindungsprotein), MBD2 (Methyl-CpG-Bindungs-Domäne Protein 2) und MBD3 (Methyl-CpG-Bindungs-Domäne Protein 3). Diese blockieren die Transkription und können zusätzlich Chromatinremodelling-Komplexe und Histon-Deacetylasen (HDAC) rekrutieren (Galm *et al.*, 2006, Abb. 2-1).

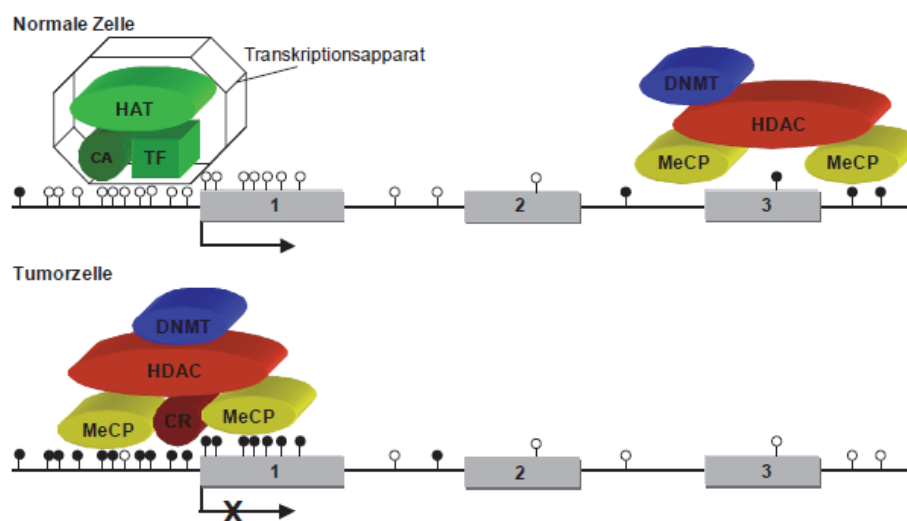


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung einer Promotorhypermethylierung in normalen Zellen und Tumorzellen. In normalen Zellen liegen CpG-Inseln, die sich typischerweise in Genpromotorregionen befinden, unmethyliert (weiße Kreise) vor. Außerhalb der Promotorregion finden sich deutlich weniger CpG-Dinukleotide, wobei diese überwiegend methyliert (schwarze Kreise) sind. Im Gegensatz dazu finden sich in Tumorzellen innerhalb der CpG-Inseln vermehrt methylierte CpG-Dinukleotide, wohingegen die außerhalb liegenden fast ausschließlich unmethyliert sind. Während in der gesunden Zelle die Transkription (Pfeil) ungehindert stattfinden kann, hat die Hypermethylierung zur Folge, dass Proteine mit einer Methylcytosin-bindenden Domäne (MeCP) an die DNA binden. Diese wiederum rekrutieren Histon-Deacetylasen (HDAC) zu den methylierten CpG-Inseln. Daraus resultiert ein spezifischer Histon-Code: die Deacetylierung von H3 und H4, der Verlust der H3K4 Methylierung sowie die Hypermethylierung von H3K9 und H3K27. Dieses Modifikationsmuster geht mit einer Kondensation des Chromatins einher und blockiert damit den Zugang von Transkriptionsfaktoren (TF) zur DNA, womit eine Transkription nicht mehr möglich ist. (graue Boxen: Exons, CA: Coaktivatorprotein, CR: Corepressor, DNMT: DNA-Methyltransferase, HAT: Histonacetyltransferase). Abbildung modifiziert nach Galm *et al.*, 2006.

2.3 Tet-Protein- vermittelte 5-Methylcytosin-Oxidation

Neben der Methylierung am 5'-Kohlenstoff des Cytosins in 5'-CpG-3' Dinukleotiden ist in den letzten Jahren die 5-Hydroxymethylierung in Verbindung mit Geninaktivierung in Tumoren gebracht worden.

Diese Form der Methylierung kommt durch TET-Proteine (*Ten-eleven-translocation*) zu Stande. Diese Proteine gehören zur Familie der DNA-Hydroxylasen und können 5-Methylcytosin (5mC) in drei konsekutiven Oxidationsreaktionen zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC) konvertieren (Abb. 2-2). Alternativ besteht die Möglichkeit, dass es zur replikationsabhängigen passiven Demethylierung kommt, da die DNA Methyltransferase DNMT1 5hmC nicht erkennt oder 5hmC wird

zu 5-Hydroxymethyluracil (5hmU) deaminiert. 5hmU, 5fC und 5caC können ferner durch Glykosylasen herausgeschnitten werden und eine putative Decarboxylase steht zudem in Verdacht 5caC direkt in Cytosin (C) zu konvertieren (Wu & Zhang, 2011). Die modifizierten Basen repräsentieren neue epigenetische Zustände der genomischen DNA oder Zwischenprodukte im Prozess der DNA-Demethylierung. Obwohl die biologische Signifikanz der TET-vermittelten Oxidation von 5mC weitestgehend unklar ist, suggeriert die Häufigkeit der 5mC-Oxidationsderivate, dass diese modifizierten Cytosin-Basen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Modulation 5mC-abhängiger genregulatorischer und biologischer Funktionen spielen. TET-Proteine sind in diverse biologische Prozesse involviert, wie etwa in die zygotische epigenetische Reprogrammierung, die Hämatopoese und die Entstehung von Leukämie (Wu & Zhang, 2011). Ferner ist bereits bekannt, dass die Abnahme an 5hmC mit der Progression von hepatozellulären Karzinomen durch Herunterregulation von TET1 einhergeht (Liu *et al.*, 2013). Reduzierte 5hmC-Level wurden zudem in humanen Prostata-, Mama-, Kolon-, Lungen-, Bauchspeicheldrüsenkarzinomen sowie Melanomen und Gliomen gefunden (Haffner *et al.*, 2011, Yang *et al.*, 2013, Lian *et al.*, 2012).

Bislang konnte gezeigt werden, dass alle drei murinen Tet Familienmitglieder (Tet1-3) sowie humanes TET1 in der Lage sind 5hmC zu generieren. Die Tet-Proteine beinhalten mehrere konservierte Domänen (Abb. 2-3). Darunter eine CXXC Domäne, die eine hohe Affinität zu gehäuft unmethylierten CpG-Dinucleotiden aufweist, die jedoch nur bei Tet1 und Tet3 zu finden ist. Des Weiteren besitzen alle drei Familienmitglieder am C-Terminus eine, für Fe(II)- und 2-Oxoglutarat (2OG)-abhängige Dioxygenasen typische, katalytische Domäne. Über diese katalytische Domäne erfolgt die Oxidation von 5mC zu 5hmC, wobei α -Ketoglutarat als Co-Substrat für die enzymatische Aktivität benötigt wird (Tahiliani *et al.*, 2009). Obwohl alle Tet-Familienmitglieder die Fähigkeit besitzen, 5mC zu oxidieren, sind die Expressionslevel in verschiedenen Zelltypen und Geweben sehr unterschiedlich (Ito *et al.* 2010). Während Tet1 und Tet2 in hohem Maße in embryonalen Stammzellen exprimiert werden, ist Tet3 vermehrt in Oozyten und 1-Zell-Zygoten zu finden. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster sind ein Hinweis darauf, dass diese Proteine nichtüberlappende biologische Funktionen hinsichtlich Entwicklungsvorgängen und Gewebespezifität haben (Wu & Zhang, 2011).

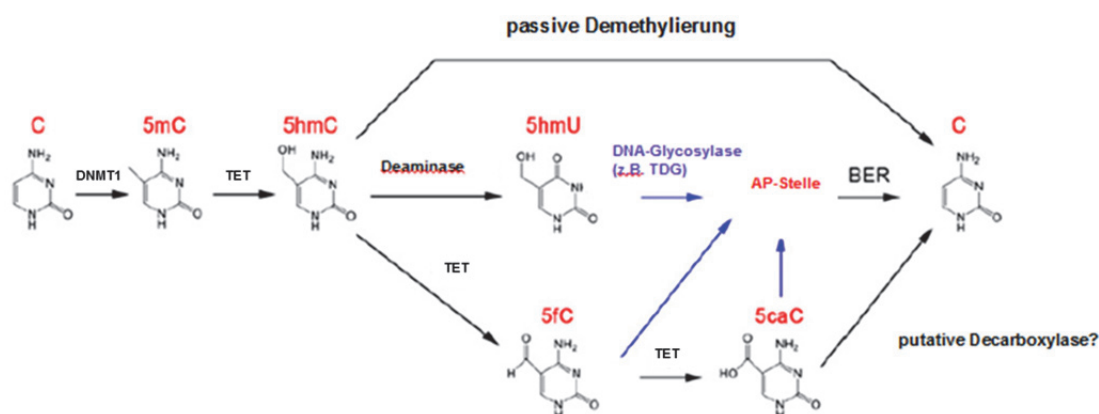


Abbildung 2-2: Modell der TET-initiierten DNA-Demethylierungswege. Die DNA-Methylierung (5mC) wird durch Methyltransferasen (DNMT) ausgeführt und aufrechterhalten. In Säugern kann 5mC durch die TET-Familie von Dioxygenasen weiter zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) oxidiert werden. 5hmC wird durch die DNMT1 nur geringfügig erkannt und kann zur replikationsabhängigen passiven Demethylierung führen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass 5hmC durch TET-Proteine zu 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC) oxidiert wird. Alternativ kann 5hmC zu 5-Hydroxymethyluracil (5hmU) deaminiert werden. 5hmU, 5fC und 5caC können ferner durch Glycosylasen wie beispielsweise TDG (*thymine DNA glycolase*) herausgeschnitten werden. Eine putative Decarboxylase steht in Verdacht, 5caC direkt in Cytosin (C) zu konvertieren. Cytosin sowie dessen Derivate sind rot gekennzeichnet. Die durch die DNA-Glycosylase TDG katalysierten Reaktionen sind mit blauen Pfeilen markiert. (AP-Stelle: *abasic site*, keine Purin- oder Pyrimidin-Stelle; BER: *base excision repair*) (modifiziert nach Wu & Zhang, 2011).

In Bezug auf die genomweite Verteilung von Tet1 und 5hmC und der Rolle bezüglich der transkriptionellen Regulation ist bekannt, dass in murinen embryonalen Stammzellen hochtranskribierte Gene mit CpG reichem Promotor sowohl mit hohen Levels an Tet1 und Histon H3/Lysin K4-Trimethylierung (H3K4me3) in der Promotorregion als auch mit hohen 5mC/5hmC-Levels im *Genebody* assoziiert sind (Wu & Zhang, 2011). Aktiv transkribierte Gene mit CpG armen Promotoren zeichnen sich durch geringe oder mittlere Tet1- und 5hmC-Levels sowohl in der Promotorregion als auch innerhalb der *Genebodies* aus (Wu & Zhang, 2011). Polycomb reprimierte Gene weisen hingegen eine Tet1-, 5hmC-, H3K4me3- sowie H3K27me-Anhäufung im Bereich von CpG-Inseln auf. Im Gegensatz dazu besitzen stillgelegte Gene wenig 5mC und 5hmC am proximalen Promotor, was mit einem geringen Tet1-Level einhergeht (Wu & Zhang, 2011). Die Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 sind ebenfalls in diesem Fall nicht zu finden. Zusammengefasst bedeutet dies, dass 5hmC eine potentielle Rolle sowohl in der transkriptionellen Repression als auch Aktivierung zugewiesen werden muss (Wu & Zhang, 2011).

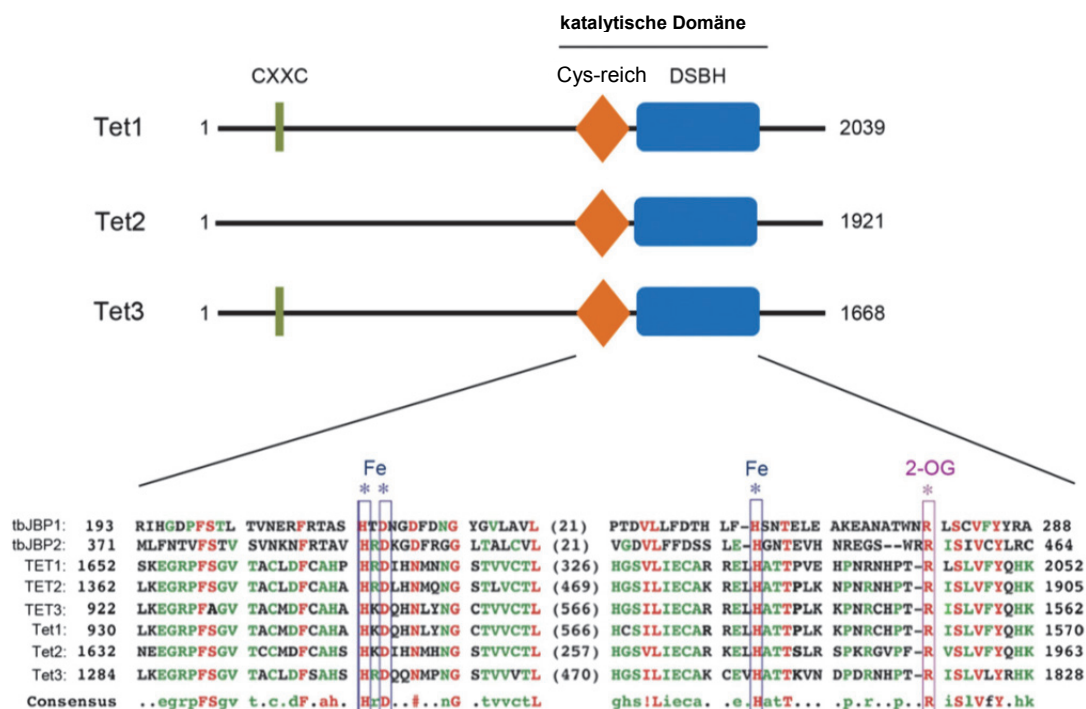


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung funktioneller Domänen von murinen Tet-Proteinen. Die Tet-Proteine bestehen, abgesehen von Tet2 aus drei konservierten Domänen: dem CXXC Zinkfinger, der Cysteine reichen Region (Cys) und der doppelsträngigen β -Helix (DSBH), wobei Cys und DSBH die katalytische Domäne bilden, die für die 2-Oxoglutarat (2-OG)- und Fe(II)-abhängige Dioxygenase-Aktivität verantwortlich ist. Die angegebenen Zahlen repräsentieren die Anzahl an Aminosäuren. Des Weiteren ist ein Sequenz-Abgleich des katalytischen Motivs der JBP/Tet-Familie von Dioxygenasen dargestellt. In die Analyse wurden folgende Sequenzen einbezogen: *Trypanosoma brucei* JBP1 (Q9U6M3) und JBP2 (Q57X81); humanes TET1 (Q8NFU7), TET2 (Q6N021), und TET3 (O43151) sowie murines Tet1 (GU079948), Tet2 (GU079949) und Tet3 (Q8BG87). Vorhergesagte Fe(II)- und 2-OG-Bindestellen sind hervorgehoben. (modifiziert nach Wu & Zhang, 2001).

2.4 CCCTC Binding Factor (CTCF)

Der CCCTC-Binding Factor (CTCF) ist ein 11-Zinkfingerprotein, das an mehr als 20000 Stellen im menschlichen Genom bindet. Es wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor des *c-myc*-Gens und des Lysoszym-Gens in Hühnern identifiziert (Baniahmad *et al.*, 1990,

Lobanenkov *et al.*, 1990). CTCF zeichnet sich durch seine vielfältigen Funktionen in der Genregulation aus. Es ist in Abhängigkeit des involvierten genetischen Locus in die transkriptionelle Aktivierung (Vostrov & Quitschke, 1997, Engel *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2009) ebenso involviert, wie in die transkriptionelle Repression (Lobanenkov *et al.*, 1990, Renaud *et al.*, 2005) oder Enhancer-Blockade (Bell *et al.*, 1990). Zudem spielt CTCF eine Rolle im Chromatin-Looping, der Chromatin-Isolation, der nukleären Organisation sowie der Chromosomen-Segregation (Splinter *et al.*, 2006, Feinberg & Tycko, 2004, Williams & Flavell, 2008).

Das Kernprotein ist von der Fruchtfliege bis zum Menschen in sämtlichen untersuchten mehrzelligen Organismen hoch konserviert (Filippova, 2008) und wird außer in Ganglien, amakrinen Zellen in der Säugetierretina und primären Spermatocyten ubiquitär exprimiert (Canto-Soler *et al.*, 2008, Luokinov *et al.*, 2002). Zwischen *Gallus gallus* (Huhn) und *Homo sapiens* (Mensch) beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz 93% im gesamten Protein, innerhalb der Zinkfingerdomäne sogar 100% (Filippova, 2008). CTCF ist Zellzyklus-abhängig im Nukleus (Zellkern) verteilt, wobei es während der Interphase im gesamten Nukleus, mit Ausnahme des Nukleolus (Kernkörperchen) zu finden ist. Während der Mitose ist CTCF an den kondensierten Chromosomen lokalisiert, in der Telophase hingegen ist es in den neugebildeten Zellkernen sowie im *Midbody* verteilt (Zhang *et al.*, 2004). Durch Poly(ADP)ribosylierung (PARylierung) des Proteins wird zudem eine nukleoläre Lokalisation ermöglicht (Torrano *et al.*, 2006).

Das Protein besteht aus 728 Aminosäuren (AS) in *Gallus gallus* und 727 AS in *Homo sapiens* und besitzt ein Molekulargewicht von 82 kDa, wobei CTCF in der SDS-PAGE, aufgrund aberranter Mobilität, als ein 130 kDa Protein detektierbar ist (Klenova *et al.*, 1997). Das Protein besteht aus drei strukturellen Domänen mit unterschiedlicher Funktionalität: N-terminale Domäne, zentrale DNA-Bindedomäne und C-terminale Domäne (Abb. 2-4). Die DNA-Bindedomäne setzt sich aus elf Zinkfinger-Motiven zusammen. Die Zink-Bindung der AS-Seitenkette führt zur Bildung einer kompakten Finger-förmigen Struktur mit α -Helix zur DNA-Erkennung. Die Bindung der DNA erfolgt in der großen Furche der DNA. Besonderes Merkmal der CTCF-DNA-Bindung ist die hohe Variation, die dadurch ermöglicht wird, dass das Protein an verschiedene CTCF-Bindestellen mit variabler Kombination der einzelnen Zinkfinger bindet (Filippova *et al.*, 1996). CTCF bindet DNA sowohl als Monomer, als auch als Dimer oder Trimer (Pant *et al.*, 2004, Yusufzai *et al.*, 2004). Die Dimerisierung erfolgt unter Beteiligung der Zinkfingerdomäne des einen sowie des C-Terminus des anderen CTCF-Moleküls. Die Zinkfingerdomäne ist zudem an weiteren Protein-Protein-Interaktionen beteiligt, ebenso wie der C- und der N-Terminus. Die Bindung von CTCF an die DNA führt zu einer Beugung dieser, die durch Bereiche im N-Terminus ausgeführt wird (Arnold *et al.*, 1996). Weiterhin ist bereits bekannt, dass CTCF-Bindestellen von positionierten Nukleosomen umgeben sind, womit CTCF eine Funktion im Chromatin-Remodelling zukommt (Fu *et al.*, 2008). Posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, PARylierung, SUMOylierung und Acetylierung können die Aktivität von CTCF regulieren. Bei der Phosphorylierung von CTCF erkennt die Proteinkinase CK2 spezifisch vier Serin-Reste eines in Vertebraten hochkonservierten Motivs im C-Terminus und modifiziert dieses (Klenova *et al.*, 2001). Diese Modifikation führt dazu, dass die reprimierende Aktivität von CTCF aufgehoben und in eine aktivierende Funktion umgewandelt wird (El-Kady & Klenova, 2005). Die N-terminale Region (AS210-250) von CTCF kann durch die Poly(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP-1) modifiziert werden. Hierbei werden unter Verbrauch von NAD^+ ADP-Ribose-Polymere unterschiedlicher Länge an die Proteine angefügt. Diese Art der Modifikation wird vor allem in Verbindung mit der Isolator-Funktion von CTCF gebracht

(Witcher & Emerson, 2009; Yu *et al.*, 2004). Weiterhin ist bekannt, dass CTCF die Transkription der rRNA abhängig von seiner PARylierung inhibiert (Torrano *et al.*, 2006). Die SUMOylierung (SUMO: *small ubiquitin like modifier*) stellt einen weiteren Mechanismus der posttranslationalen Modifikation dar, wobei ein kleines Peptid kovalent an das zu modifizierende Protein angehängen wird. Die SUMOylierung von CTCF kann sowohl am C- als auch am N-Terminus erfolgen. Diese Modifikation wurde mit der reprimierenden Funktion von CTCF in der *c-myc*-Expression in Verbindung gebracht (MacPherson *et al.*, 2009). Eine Acetylierung von CTCF scheint ebenfalls möglich zu sein (Choudhary *et al.*, 2009).

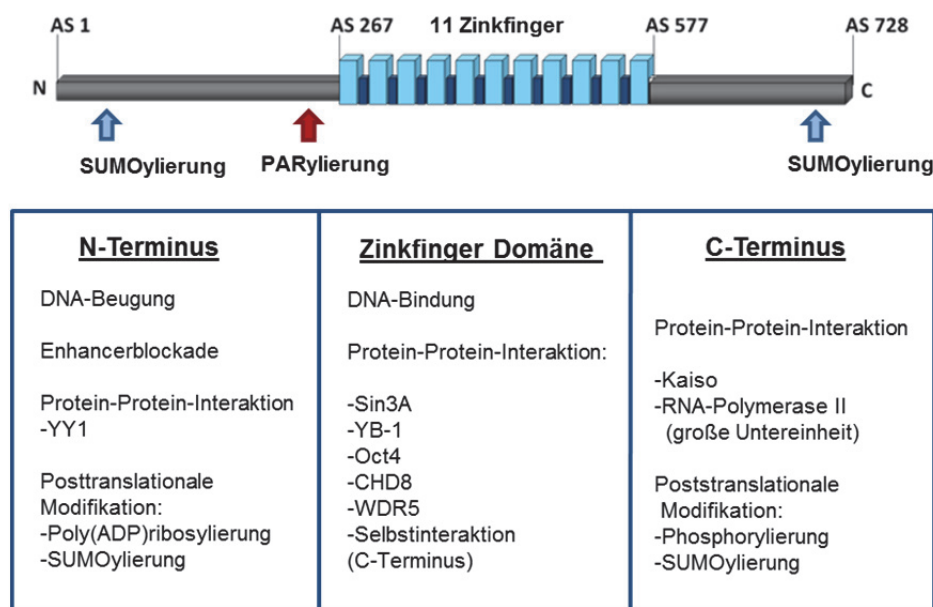


Abbildung 2-4: Schematischer Aufbau von CTCF. Dargestellt sind die drei Protein-Domänen und ihre jeweilige Funktion sowie Stellen, die posttranslational modifiziert werden können und mögliche Interaktionspartner. (Verändert nach Diss. Paprotka, 2010).

Als multifunktionales Protein ist CTCF auch in die epigenetische Regulation involviert. Ein gut charakterisiertes Beispiel stellt der IGF2 (*insulin-like-growth factor 2*) / H19-Genlocus dar. Innerhalb dieses Locus findet sich die *imprinting*-Kontrollregion (ICR), die allelabhängig methyliert (paternales Allel) oder unmethyliert (maternales Allel) vorliegt. Stromabwärts vom H19-Gen ist ein *Enhancer* lokalisiert, der IGF2 und H19 beeinflusst. CTCF bindet an die ICR, des maternalen, unmethylierten Allels (Bell & Felsenfeld, 2000), was zur Blockade der Wirkung des *Enhancers* auf den IGF2-Promotor führt. Dies wiederum hat zur Folge, dass IGF2 im Gegensatz zu H19 vom maternalen Allel nicht exprimiert wird. Die auf dem paternalen Allel liegende methylierte ICR wird hingegen von CTCF nicht gebunden, wodurch der *Enhancer* auf den IGF2-Promotor wirken kann und somit die Expression des Gens anschalten kann. H19 wird in diesem Fall, aufgrund der Methylierung nicht exprimiert. Abnormale Methylierungsmuster von CTCF-Bindestellen, die in die IGF2/H19 Imprinting-Kontrolle involviert sind, werden mit Kolorektalen-, Wilms- und Blasen Tumoren assoziiert (Nakagawa *et al.*, 2001, Cui *et al.*, 2001, Takai *et al.* 2001). Der zuvor beschriebene Mechanismus verdeutlicht, dass CpG-Methylierungen an CTCF-Bindestellen eine CTCF-Bindung verhindern. Zudem wird die Ausbreitung von CpG-Methylierungen unterbunden,

womit nahegelegene Promotoren vor epigenetischer Stilllegung durch Methylierung geschützt sind (Filippova, 2008). Es gibt jedoch auch Befunde, dass CTCF-Bindestellen eine durchschnittliche Methylierung von 20% aufweisen mit zunehmender Methylierung in angrenzenden Bereichen (Stadler *et al.*, 2011). Stadler *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass durch eine bestehende Methylierung die CTCF-Bindung nicht geblockt wird und in einer lokalen reduzierten Methylierung resultiert, woraus sie schlussfolgerten, dass CTCF an pre-methylierte CpG-arme CTCF-Bindestellen binden kann, was zu einer lokalen Demethylierung führt. CTCF wird zudem eine Rolle in der Regulation von Tumorsuppressorgenen zugewiesen. Beispielsweise wurde vor kurzem ein neuer Mechanismus für CTCF in der epigenetischen Regulation des pro-apoptotischen Gens *Bax* entdeckt. In diesem Fall agiert CTCF als transkriptionaler Repressor, der den Einflüssen positiver Regulationsfaktoren entgegenwirkt. Die Depletion von CTCF in Brustkrebszellen führt zur Aktivierung von *Bax* und Apoptose (Méndez-Catalá *et al.*, 2013). Bereits seit längerem ist bekannt, dass CTCF den Retinoblastom-Gen-Promotor (*Rb*), eine CpG-Insel, vor DNA-Methylierung schützt. Kommt es zu einer abnormalen Methylierung dieser Kontrollregion, induziert das Methyl-CpG-Bindeprotein Kaiso und ein wahrscheinlich assoziierter Repressorkomplex die epigenetische Stilllegung des *Rb*-(Retinoblastom) Promotors (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von CTCF in der Regulation von Tumorsuppressorgenen ist der Befund, dass die epigenetische Stilllegung des Tumorsuppressors p16^{INK4a} mit dem Verlust der CTCF-Bindung und einer Chromatin-Isolationsstelle einhergeht, wobei fehlerhafte PARylierung und Dissoziation vom molekularen Chaperon Nucleolin eine Rolle spielen (Witcher & Emerson, 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass CTCF den p53-Gen-Promotor gegenüber repressiven Histonmarkierungen schützt (Soto-Reyes & Recillas-Targa, 2010). Zudem wird angenommen, dass CTCF selbst als Tumorsuppressorgen wirkt. Beispielsweise hat man für einige Krebsentitäten Mutationen der CTCF-Bindestellen identifiziert, die eine Bindung von CTCF verhindern (Filippova *et al.*, 2002). Weiterhin ist CTCF in einer Region kodiert (16q21-q22.3), die in einigen Tumoren deletiert ist (Filippova *et al.*, 2002).

2.4.1 Der paraloge Faktor BORIS

Im Jahr 2002 wurde das Protein BORIS (*Brother of Regulator of Imprinted Sites*) oder CTCFL (*CTCF-like*) als paraloger Faktor von CTCF in Mäusen sowie im Mensch identifiziert. BORIS wird ausschließlich im Testis-Gewebe und diversen Krebsarten exprimiert (Loukinov *et al.*, 2002, Vatolin *et al.*, 2005), womit er der Familie der *cancer-testis*-Gene zugeordnet wird. Im Gegensatz zu CTCF, das in erster Linie im Nukleus von somatischen Zellen exprimiert wird, findet sich BORIS vorwiegend im Zytoplasma von Spermatozyten (Loukinov *et al.*, 2002). Während die Zinkfingerdomäne von BORIS und CTCF hinsichtlich der Genstruktur übereinstimmt, weisen die N- und C-terminalen Regionen deutliche Unterschiede auf (Loukinov, 2002). Auch wenn die DNA-Bindedomänen der beiden Faktoren eine hohe Übereinstimmung zeigen, unterscheiden sie sich dahingehend, dass BORIS im Gegensatz zu CTCF hypermethylierte DNA bindet (Nguyen *et al.*, 2008). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Genen besteht darin, dass BORIS in einem Locus auf Chromosom 20q13 liegt, der in vielen Tumoren amplifiziert ist (Klenova *et al.*, 2002). BORIS wird eine Rolle hinsichtlich der epigenetischen Genom-Reprogrammierung in Testis (Loukinov *et al.*, 2002) und in der Proliferation von Krebszellen (D'Arcy *et al.*, 2008) zugesprochen, wobei die

zugrundeliegenden Mechanismen weitestgehend unbekannt sind. Ferner konnte gezeigt werden, dass BORIS als Genregulator männlicher Geschlechtszellen bevorzugt in der Nähe von Promotoren mit aktiven Chromatinmarkierungen bindet. Im Gegensatz zu CTCF, ist BORIS mit relativ offenem Chromatin assoziiert und es wird angenommen, dass BORIS die Aufrechterhaltung des epigenetischen Status einiger Gen-Promotoren und damit die Genexpression während der Spermatogenese fördert (Sleutels *et al.*, 2012).

2.5 Untersuchte Kandidatengene

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene untersucht, die potentiell durch CTCF reguliert werden, wobei der Focus auf der Analyse von Tumorsuppressorgenen lag. Die Auswahl der Gene basierte dabei hauptsächlich auf den Daten eines genomweiten CTCF-*Knockdown*-Screens in HeLa-Zellen (Wendt *et al.*, 2008), einem genomweiten Microarray nach CTCF-Induktion in Tetrazyklin-abhängig chCTCF-exprimierenden HEK-Zellen (siehe Punkt 3.2.8.2) sowie öffentlich zugänglichen ChIP-Seq-Daten. In die Analysen einbezogen wurden Gene, die nach CTCF-*Knockdown* eine signifikant herunterregulierte Expression oder nach CTCF-Induktion eine signifikante Hochregulation der Expression aufwiesen sowie CTCF-Bindestellen besitzen. Zu den Kandidaten, die diese Voraussetzung erfüllten, gehören allen voran die Gene *AATK* (*Apoptosis-associated tyrosine kinase*) sowie *DUSP2* (*Dual-specificity phosphatase 2*). Ebenfalls untersucht wurden Mitglieder der *Ras-Association Domain Family* (RASSF), von denen einige als Tumorsuppressorgene beschrieben wurden.

2.5.1 *Apoptosis-associated tyrosine kinase (AATK)*

Die Apoptose-assoziierte Tyrosin-Kinase 1 (AATK oder LMR1) wurde ursprünglich als Protein identifiziert, das während der terminalen Differenzierung und der Apoptose in einer nicht-tumorassoziierten murinen Myeloidzelllinie (32Dcl) dramatisch hochreguliert ist (Gaozza *et al.*, 1997). AATK wird im hohen Maße in unterschiedlichen Hirnregionen exprimiert, geringere Genprodukte finden sich in diversen Geweben; darunter Herz, Lunge, Niere und Skelettmuskeln (Gaozza *et al.*, 1997, Raghunath *et al.*, 2000, Tomomura *et al.*, 2003 und 2007). Das Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und das Protein beinhaltet eine Tyrosinkinase-Domäne am N-Terminus und ein, aus 16 PXXP Motiven bestehendes, Prolin-reiches SH3-Bindemotiv am C-Terminus. Es wurden bislang zwei Isoformen gefunden, die als AATKA und AATKB bezeichnet werden. *AATKA* kodiert ein zytoplasmatisches Protein mit einem offenen Leseraster von 1317 Aminosäuren, während AATKB eine weitere Transmembrandomäne am N-Terminus besitzt, die 57 Aminosäuren einnimmt (Tomomura *et al.*, 2007). Die Analysen hinsichtlich *AATK* beschränkten sich in der vorliegenden Arbeit auf die längere Isoform. Befunde über die funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Isoformen existieren derzeit nicht.

Die meisten funktionellen AATK-Studien befassen sich mit den Aufgaben im Nervensystem. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Hochregulation der AATK-Expression während der neuronalen Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen (P19) durch Retinsäure induziert wird (Tomomura *et al.*, 2007). Zudem scheint AATK eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems zu spielen, wobei es eine duale Funktion übernimmt. Zum

Einen das Fördern der terminalen neuronalen Differenzierung (Raghunath *et al.*, 2000), zum Anderen die Verstärkung der Apoptose reifer zerebellärer Granula-Zellen (Tomomura *et al.*, 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass AATK die Zellproliferation, Koloniebildung und Migration von Melanomzellen hemmt sowie die Apoptose in diesen Zellen fördert (Ma & Rubin, 2014). Zudem wird AATK während dem Wachstumsstillstand und der Apoptose von myeloiden Vorläuferzellen induziert (Gaozza *et al.*, 1997) und die AATK-Expression ist in Adenokarzinomen des Darms vermindert (Lee *et al.*, 2006). Hinsichtlich des Einflusses von CTCF auf die AATK-Expression, zeigen die Daten von Wendt *et al.*, dass die Depletion von CTCF in einer 1,6-fachen Herunterregulation der AATK-RNA resultiert.

2.5.2 *Dual-specificity phosphatases (DUSPs)*

Dual-specificity phosphatases (DUSPs) bilden eine heterogene Gruppe von Protein-Phosphatasen, die innerhalb eines Substrates sowohl Phosphotyrosine als auch Phosphoserin/Phosphothreonin-Reste dephosphorylieren können. Sie gelten als wichtige Modulatoren bedeutender Signalwege und sind in unterschiedlichen Erkrankungen fehlreguliert (Patterson *et al.*, 2009). Die 61 identifizierten DUSPs werden auf Basis ihrer Sequenzähnlichkeiten und dem Vorhandensein spezifischer Domänen in sechs Untergruppen klassifiziert: *Slingshot* Phosphatasen, PRLs (*phosphatases of regenerating liver*), Cdc14 (*cell division cycle*) Phosphatasen, PTENs (*phosphatase and tensin homologues deleted on chromosome 10*), MKPs (*mitogen-activated protein kinase phosphatases*) und atypische DUSPs.

In der vorliegenden Arbeit konzentrierte sich die Analyse auf MKPs, wobei DUSP2 (PAC-1) im Fokus stand. Die MKPs gehören zu der best-charakterisiertesten Untergruppe und umfassen zehn Proteine (siehe Abb. 2-5). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) an Phosphothreonin- und Phosphotyrosinresten innerhalb des MAPKTXY (Thr-AXaa-Tyr) Aktivierungsmotivs gleichzeitig dephosphorylieren und damit als Antagonisten auf assoziierte Signalkaskaden wirken können (Patterson *et al.*, 2009). Die MKPs besitzen eine hochkonservierte C-terminale katalytische Domäne. In der N-terminalen regulatorischen Domäne finden sich zwei CDC25/*Rhodanese*-ähnliche Regionen sowie das *Kinase interaction motif* (KIM), für die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Bindung (Abb. 2-5). Die Mitglieder der MKP-Familie weisen Unterschiede hinsichtlich des benötigten Substrates, der Verteilung im Gewebe, der subzellulären Lokalisation sowie der Mechanismen der Induzierbarkeit der Expression durch extrazelluläre Stimuli auf. DUSP1, DUSP2, DUSP4 und DUSP5 sind im Zellkern zu finden, dephosphorylieren ERKs (*extracellular-signal regulated kinases*), JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und p38 MAPKs gleichermaßen und werden durch Wachstums- oder Stresssignale induziert. DUSP6, DUSP7 und DUSP9 sind zytoplasmatische, ERK spezifische MPKs, während DUSP8, DUSP16 und DUSP10 zytoplasmatisch und nukleär vorliegen, JNK und p38 erkennen und p38 und JNK MAPKs inaktivieren können. Insgesamt gesehen fungieren MKPs somit als Negativregulator der Mitglieder der MAPK-Superfamilie (MAPK/ERK, SAPK/JNK und p38), die mit Zell-Proliferation und Differenzierung in Verbindung gebracht werden (Wei *et al.*, 2013).

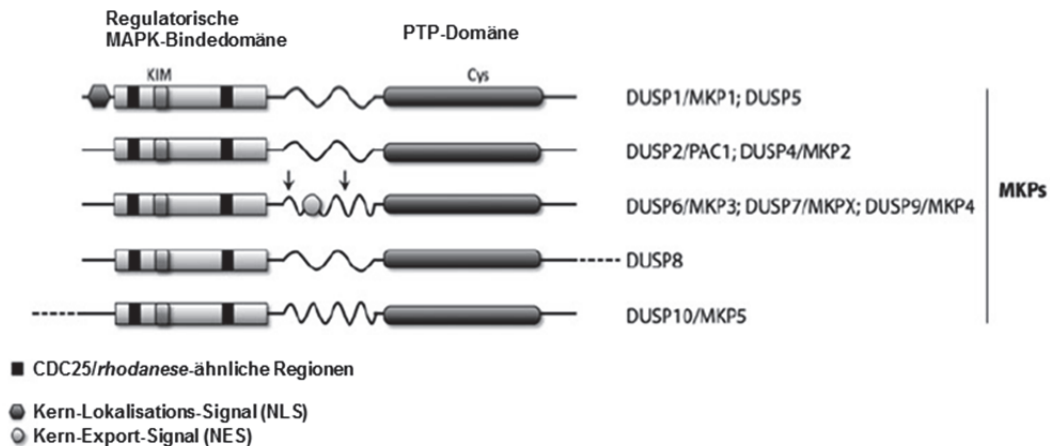


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der zu den MKPs (*mitogen-activated protein kinase phosphatases*) zugehörigen DUSPs (*dual-specificity phosphatases*). MKPs besitzen eine N-terminale regulatorische Domäne, die zwei CDC25/Rhodanese-ähnliche Regionen und das *Kinase interaction motif* (KIM), für die MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Bindung, gefolgt von einer Linkerregion mit variabler Länge, enthält. Die C-terminal gelegene katalytische PTP (Protein Tyrosine Phosphatase)-Domäne beinhaltet das Redox-sensitive Cystein (Cys). (Verändert nach Ríos *et al.*, 2014)

Wie bereits erwähnt, stand DUSP2 im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit. Das humane *DUSP2* ist auf Chromosom 2 zwischen 96808905 und 96811179 bp (GRCh37) lokalisiert und kodiert zwei Transkripte, wobei lediglich aus Einem ein 314 AS Protein hervorgeht. Das 32 kDa große Protein DUSP2 wird vorwiegend in hämatopoetischen Geweben mit hohem T-Zell-Gehalt, wie dem Thymus, der Milz, den Lymphknoten, dem peripheren Blut oder aber auch anderen Organen wie Gehirn und Leber exprimiert (Rohan *et al.*, 1993, Boschert *et al.*, 1997 und Gum *et al.*, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass DUSP2 ursprünglich aus hämatopoetischen Zellen kloniert wurde, standen zunächst Analysen im Mittelpunkt, die auf die Funktion von DUSP2 im Immunsystem abzielten. DUSP2 wird diesbezüglich eine kritische und positive Rolle hinsichtlich inflammatorischer Antworten zugewiesen (Wei *et al.*, 2013). In den letzten Jahren jedoch wurde DUSP2 auch mit pathologischen Prozessen bei Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Anfänglich wurde DUSP2 als massiv exprimierte Protein-Tyrosin-Phosphatase in hämatopoetischem Gewebe beschrieben, die eine entscheidende Rolle in der Inaktivierung des ERK-Signalweges spielt. So konnten diverse Studien zeigen, dass die Aktivierung der ERK-Kaskade in zunehmender DUSP2-Expression resultiert (Rohan *et al.*, 1993, Ward *et al.*, 1994). Überraschenderweise konnte man in humanen, akuten Leukämien eine Herunterregulation von DUSP2 beobachten, die signifikant mit einer Hyper-Expression der ERK-Aktivierung korreliert (Kim *et al.*, 1993). Lin *et al.* konnten 2011 zeigen, dass die *DUSP2* mRNA sowie das Protein in vielen Krebsentitäten (Brust-, Kolon-, Lungen-, Eierstock-, Nieren- und Prostatakrebs) signifikant reduziert ist und eine DUSP2-Suppression mittels Hypoxie mit maligner Tumorgenese und erhöhter Chemoresistenz assoziiert ist. Weiterhin ist bekannt, dass DUSP2 infolge einer p53-Aktivierung und dadurch ausgelöster Apoptose induziert wird (Yin *et al.*, 2003). Sano *et al.* schlugen DUSP2 zudem als prognostischen Marker für Brustkrebs vor (Sano *et al.*, 2012). Wie zuvor erwähnt, ist die *DUSP2* mRNA in vielen Krebsentitäten herunterreguliert. In Zellen maligner Ergüsse in Ovarialkarzinomen hat man jedoch erhöhte *DUSP2* mRNA-Level detektiert, die signifikant mit einer schlechten Krankheitsprognose einhergehen (Givant-Horwitz *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde DUSP2 als direktes transkriptionelles Ziel von E2F-1 im Apoptosesignalweg identifiziert (Wu *et al.*, 2007), wobei E2F-1 die Aktivität des Rb (Retinoblastom) Tumorsuppressors vermittelt und durch Transkriptionsregulation der

Zielgene eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt. Befunde, die zeigen, dass *DUSP2* auch epigenetisch beeinflusst wird, existieren bereits. So konnten Demircan *et al.* 2009 nachweisen, dass *DUSP2* in murinen und humanen Mammakarzinom-Zelllinien durch Promotorhypermethylierung stillgelegt ist. Eine Hypermethylierung in humanen, primären Brusttumoren konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ferner wurde über eine *DUSP2*-Hypermethylierung in Prostatakrebs berichtet (Yu *et al.*, 2005). Den CTCF-*Knockdown*-Daten von Wendt *et al.* zufolge ist CTCF in die Regulation der *DUSP2*-Expression involviert; nach CTCF-Depletion wird die *DUSP2*-Expression um den Faktor 1,8 reduziert.

Neben *DUSP2* wurden auch *DUSP8* und *DUSP10* am Rande in die Analysen der vorliegenden Arbeit mit einbezogen. Den genomweiten Untersuchungen zufolge werden auch diese beiden Gene durch CTCF beeinflusst. *DUSP8* ist auf Chromosom 11 (11p15.5) lokalisiert, das Genprodukt wird vorwiegend im adulten Hirn, Herz und Skelettmuskel exprimiert und wird durch *nerve growth factor* und Insulin induziert (RefSeq, 2008). Ein Intron-loses Pseudogen von *DUSP8* findet sich auf Chromosom 10 (10q11.2). Ein CpG-SNP (*Single-Nucleotide polymorphisms*) in *DUSP8* wurde mit geänderter DNA-Methylierung in humanen Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse und folglich mit TypII-Diabetes in Verbindung gebracht (Dayeh *et al.*, 2013). Ferner wurde von einer Abnahme der *DUSP8*-Expression durch die Antikarzinogene Phenylethyl-Isothiocyanat und Pyrrolidin-Dithiocarbamat, verbunden mit gesteigerter Jnk-Aktivierung und erleichterter Apoptose, in humanen Krebszelllinien berichtet (Chen *et al.*, 2001 und 2002). Diese Beobachtung lässt darauf hoffen, dass die Inhibition von *DUSP8* in Krebszellen einen positiven Effekt erzielt.

DUSP10 wird in vielfältigen Geweben und Organen exprimiert. Der Immun-Phenotyp der *DUSP10 Knockout*-Maus lässt darauf schließen, dass *DUSP10* sowohl eine Rolle hinsichtlich der angeborenen als auch der adaptiven Immunität spielt (Ríos *et al.*, 2014). *DUSP10* ist außerdem in vielen humanen Karzinomen hochreguliert; ebenso in Pankreatitis bei Ratten. Die Aktivierung von *DUSP10* resultiert in verminderter p38a Phosphorylierung und wurde mit dem Verhindern der H₂O₂-induzierten Seneszens in humanen Brustkrebszellen durch Prdx1 assoziiert (Turner-Ivey *et al.*, 2013).

2.5.3 *Ras-Association Domain-Family (RASSF)*

Die *RAS-Association Domain-Family* umfasst zehn Mitglieder (*RASSF1-RASSF10*) mit zum Teil mehreren Isoformen. Ein charakteristisches Merkmal dieser Familie ist die *Ras-association domain* (RA), die entweder C-terminal (*RASSF1-RASSF6*) oder N-terminal (*RASSF7-RASSF10*) vorliegt und Kennzeichen von Ras-Effektoren und Ras-zugehörigen GTPasen ist (Richter *et al.*, 2009). *RASSF1 - RASSF6* besitzen zudem eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Sav-*RASSF*-Hpo (SARAH)). *RASSFs* sind in vielzählige zelluläre Mechanismen involviert, wie etwa in die Apoptose, die Zell-Zyklus-Kontrolle und die Mikrotubulli-Stabilisierung (Richter *et al.*, 2009). Für einige Mitglieder wurde zudem eine tumorsupprimierende Wirkung beschrieben. So sind beispielsweise verschiedene *RASSF*-Transkripte (*RASSF1A*, *RASSF2*, *RASSF5A*, *RASSF5C* und *RASSF10*) durch Hypermethylierung ihrer CpG-Insel-Promotoren in unterschiedlichen Krebsentitäten stillgelegt (Dammann *et al.*, 2005; van der Weyden & Adams, 2007; Hesson *et al.*, 2003 und 2005, Macheiner *et al.*, 2006, Schagdarsurengin *et al.*, 2009 und 2010; Richter *et al.*, 2012). In der

vorliegenden Arbeit wurde *RASSF5* besondere Aufmerksamkeit geschenkt, da erste Befunde auch hier eine Beteiligung von CTCF hinsichtlich der *RASSF5*-Regulation andeuteten. *RASSF5* wird häufig auch als NORE1 (*Novel Ras Effector 1*) bezeichnet. Es existieren drei Isoformen (*RASSF5A*, *RASSF5B* und *RASSF5C*), die aus alternativem *Splicing* und differentiellem Promotorgebrauch resultieren (Richter *et al.*, 2009), wobei *RASSF5A* und *RASSF5C* von zwei separaten CpG-Insel-Promotoren transkribiert werden (Abb. 2-6). Beide Isoformen werden in normalem Gewebe exprimiert, in einigen Krebszelllinien (Tommasi *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2003, Vos *et al.*, 2003) hingegen sind sie herunterreguliert. Auch in Primärtumoren wurden Promotormethylierungen für *RASSF5A* (Thyroidkarzinome, Neuroblastome, Paragangliome des Abdomen) und *RASSF5C* (Hepatozelluläre Karzinome) gefunden (Schagdarsurengin *et al.*, 2010, Hesson *et al.*, 2003, Macheiner *et al.*, 2006). Ferner ist bekannt, dass *RASSF5A* wachstumssuppressive Eigenschaften besitzt (Moshnikova *et al.*, 2006) und *RASSF5C* eine Rolle in lymphoiden Organen im murinen System spielt (Katagiri *et al.*, 2004).

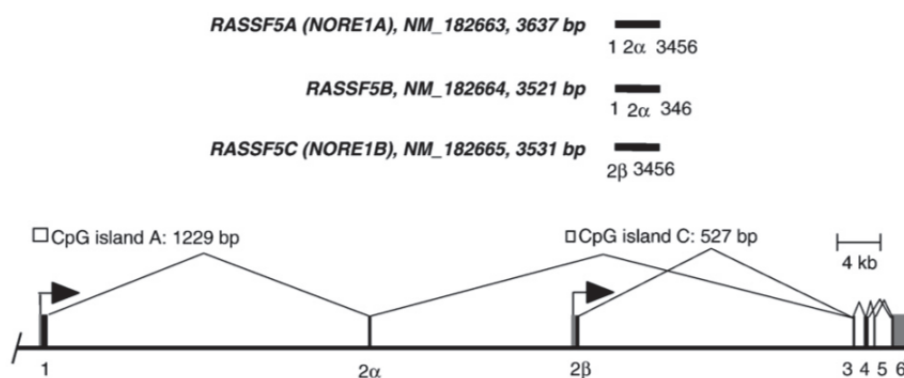


Abbildung 2-6: Genarrangement von *RASSF5*. *RASSF5* kodiert für sieben Exons (1, 2 α , 2 β , 3, 4, 5, 6). Dargestellt sind drei Isoformen *RASSF5A* (*NORE1A*), *RASSF5B* und *RASSF5C* (*NORE1B*), wobei *RASSF5A* und *RASSF5C* von zwei unterschiedlichen CpG-Insel-Promotoren (CpG *island*) transkribiert werden (Richter *et al.*, 2009).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Diverse in der Literatur zu findende Daten deuten darauf hin, dass der multifunktionale Faktor CTCF (*CCCTC-binding factor*), auch in die Regulation von Tumorsuppressorgenen (TSG) involviert ist. Es gibt Hinweise, dass eine Fehlregulation von CTCF die epigenetische Stilllegung von TSGs zur Folge hat, was wiederum zur Karzinogenese beitragen kann. Daten einer Transkriptom-Analyse nach CTCF-*Knockdown* in HeLa-Zellen (Wendt *et al.*, 2008) zeigen, dass die Herunterregulation der CTCF-Expression sowohl den Anstieg, als auch die Verringerung der Expression unterschiedlicher Gene bewirkt. Basierend auf diesen Daten wurden die beiden putativen Tumorsuppressorgene *AATK* und *DUSP2* ausgewählt, da beide eine signifikante Herunterregulation der Expression nach CTCF-Depletion aufwiesen. Neben diesen beiden Kandidaten wurden Mitglieder der RASSF (*Ras-Association domain family*)-Familie in die Analyse einbezogen, da für einige eine tumorsupprimierende Wirkung beschrieben wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kandidatengene zunächst hinsichtlich ihres Methylierungsstatus, ihrer RNA-Expression und einer möglichen Korrelation zwischen diesen beiden Parametern zu charakterisieren und im Anschluss den Einfluss von CTCF auf die Kandidatengene zu erfassen sowie einen möglichen Mechanismus zu detektieren, über den CTCF die epigenetische Regulation der TSGs bewerkstelligt. Bei putativen TSGs sollte zusätzlich eine tumorsuppressorische Wirkung mittels *Colony Formation Assays* untersucht werden. Der Einfluss von CTCF auf die RNA-Expression der Kandidatengene sollte durch CTCF-*Knockdown* sowie CTCF-Überexpression erfasst werden. Mittels Luciferaseassay sollte zudem der Einfluss von CTCF auf den *DUSP2*-Promotor *in vitro* analysiert werden. Die Bedeutung einzelner CTCF-Domänen hinsichtlich der Regulation der Kandidaten, sollte durch Überexpression unterschiedlicher CTCF-Deletionskonstrukte und anschließender Expressionsanalyse analysiert werden. Zudem sollte die Rolle von CTCF-Modifikationen (SUMOylierung, PARYlierung) untersucht werden. Um ein System nutzen zu können mit dem die CTCF-Expression gezielt angeschaltet werden kann, sollte eine stabile induzierbare Zelllinie etabliert werden. Ferner sollten durch CTCF-Überexpression / *Knockdown* hervorgerufene Änderungen im Methylierungsmuster (5mC und 5hmC) unter Verwendung unterschiedlicher Techniken detektiert werden. Neue durch CTCF regulierte Kandidatengene sollten außerdem mit Hilfe eines genomweiten Methylierungsscreens sowie einer genomweiten Expressionsanalyse (Microarray) nach CTCF-Überexpression gefunden werden.

Zusammengefasst bestand das Ziel der Arbeit darin, den Einfluss von CTCF auf die Regulation ausgewählter TSGs (*AATK*, *DUSP2*, *RASSFs*) zu analysieren und den genauen Mechanismus der CTCF gesteuerten Regulation aufzudecken.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Merck KGaA, Darmstadt
Agar Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	LE Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Chloroform (Trichlormethan)	Merck KGaA, Darmstadt
Complete Proteaseinhibitorenmix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
dNTPs	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dynabeads [®]	Life Technologies GmbH, Darmstadt
EDTA	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 96% (rein/vergällt)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Formamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

Glycogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HEPES	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Hydrochinon	Merck KGaA, Darmstadt
Immobilon Western Chemiluminescent	Millipore GmbH, Schwalheim/Ts
HRP Substrate	
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natrium-Metabisulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nonidet P40	Fluka Biochemica, Ulm
Orange G	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Protein G-Plus/Protein A Agarose beads	Calbiochem, Merck, Darmstadt
RNA-Lysis Reagenz	5 Prime, Hilden
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
SAM	New England BioLabs, Schwalbach
SDS	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Streptavidin Sepharose	GE Healthcare, München
Sodium Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

SYBR® Select Master Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TEMED	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Triton X100	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Tween20	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Wasser, DEPC-behandelt	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
X-Gal	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

3.1.2 Längenstandards/ Molekulargewichtsstandard

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PageRuler Prestained	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3.1.3 Antibiotika für die Kultivierung von humanen Zellen

PS-Lsg. (10 U/μl Pen. / 10 μg/μl Strep.)	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Geneticin (G418)	Biochrom, Berlin
Blasticidin S HCL	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tetrazyklin	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.1.4 Antibiotika für *E.coli*

Kanamycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ampicillin (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

3.1.5 Zellkulturmedien

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
OPTI-MEM® I	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
RPMI	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.1.6 Zusätze für die Zellkultur

Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
FCS Tetrazykl. reduziert	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
L-Glutamin	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Insulin	Hersteller unbekannt; Lösung von AG K. Wendt, Rotterdam, Holland
Hydroxycortison	Hersteller unbekannt; Lösung von AG K. Wendt, Rotterdam, Holland

3.1.7 Chemikalien im Einsatz in der Zellkultur

3-ABA	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trichostatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5-Aza-dC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TrypLE™ Express Enzyme (1X)	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.1.8 Transfektionsreagenzien

PEI	Polyplus-Transfection SA, Illkirch, France
jetPEI	Polyplus-Transfection SA, Illkirch, France
X-tremeGENE HP	Roche Applied Science, Mannheim
Turbofect	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lipofectamin™ RNAimax	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.1.9 Lösungen und Puffer

3.1.9.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

DNA-Ladepuffer	Saccharose	22,5 g
	TBE-Puffer (10x)	6 ml
	Orange G	0,5 g
	<i>ad</i> steriles dH ₂ O auf ein Endvolumen von 50 ml	

dNTPs	Ausgangskonzentration je	100 mM
	dATP	25 µl
	dCTP	25 µl
	dGTP	25 µl
	dTTP	25 µl
	<i>ad</i> 900 µl steriles ddH ₂ O	
	Arbeitskonzentration	2,5 mM

EDTA • Na ₂ (pH 8; 0,5 M)	Di-Natrium-Ethylen-	
	diamintetraacetat • H ₂ O	9,3 g
	<i>ad</i> 35 ml dH ₂ O, <i>ad</i> 5 ml 3 M NaOH	
	<i>ad</i> NaOH sukzessive bis sich EDTA löst, auf pH 8 einstellen	
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf 50 ml Endvolumen; autoklavieren	

Glycogen (20 mg/ml)	Glycogen	20 mg
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf 1ml Endvolumen	

Hydrochinon (0,1 M)	Hydrochinon	0,11 g
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf 10 ml Endvolumen	

Längenstandards

100 bp Leiter	Ausgangskonzentration	500 ng/μl
	Endkonzentration	100 ng/μl
	Marker	80 μl
	Ladepuffer	66,4 μl
	TBE (10x)	20 μl
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 400 μl	

1 kb/ 1 kb Plus Leiter	Ausgangskonzentration	100 ng/μl
	Endkonzentration	20 ng/μl
	Marker	100 μl
	Ladepuffer	83 μl
	TBE (10x)	25 μl
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 500 μl	

NaAc	Natriumacetat	12,3 g
(pH 5,2; 3 M)	pH auf 5 bis 5,3 mit Essigsäure einstellen	
	<i>ad</i> steriles dH ₂ O auf 50 ml Endvolumen;	
	autoklavieren	

Na-Bisulfit	Natriumbisulfit	3,8 g
(pH 5,5; 3,6M)	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf 8 ml Endvolumen	
	<i>ad</i> NaOH (3 M) auf 10 ml Endvolumen	

NaOH	Natriumhydroxid	1,2 g
(3 M)	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf 10 ml Endvolumen	

NH ₄ Ac (7,5 M)	Ammonium-Acetat <i>ad</i> steriles dH ₂ O auf 50 ml Endvolumen; autoklavieren	28,9 g
PBS (10x)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ • H ₂ O K ₂ HPO ₄ <i>ad</i> steriles ddH ₂ O; autoklavieren	1 M 20 mM 60 mM 8 mM
Phenol/Chloroform	Phenol Chloroform	50 ml 50 ml
Proteinase K Puffer	Tris/HCl pH 7,6 EDTA • Na ₂ NP40 SDS <i>ad</i> steriles ddH ₂ O	50 mM 25 mM 0,5% 0,5%
SDS (20%)	Sodiumdodecylsulfat <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l	200 g
TAE-Puffer	Tris (pH 7,8) Na-Acetat 2Na EDTA <i>ad</i> steriles ddH ₂ O	40 mM 0,5 mM 0,01 mM

TBE-Puffer (10x)	Tris/HCl	1 M
	Borsäure	0,8 M
	EDTA • Na ₂	10 mM
	<i>ad</i> steriles dH ₂ O	
TBS-Puffer (10x)	Tris HCl	50 mM
	NaCl	1,4 M
	pH 7,6 mit HCl einstellen	
TE-Puffer	Tris/HCl pH 7,6	10 mM
	EDTA • Na ₂	1 mM
	<i>ad</i> steriles dH ₂ O; autoklavieren	
Trichostatin (Stock)	Endkonzentration	500 µg/ml
	gelöst in sterilem dH ₂ O	
Tris/HCl (pH var.; 1 M)	Tris/HCl	121,1 g
	pH mit HCl einstellen	
	<i>ad</i> steriles dH ₂ O auf 1 l Endvolumen	

3.1.9.2 Puffer für Chromatin-Immunopräzipitation

<i>Dilutionbuffer</i>	SDS	0,01%
	Triton X 100	1,1%
	EDTA	1,2 mM
	Tris/HCL pH 8,1	16,7 mM
	NaCl	167 mM
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O	

Hochsalzpuffer	SDS	0,1%
	Triton X 100	1%
	EDTA	2 mM
	Tris/HCl pH 8,1	20 mM
	NaCl	500 mM
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O	
LiCL-Puffer	Lithiumchlorid	0,25 M
	Nonidet P-40	1%
	Deoxycholat	1%
	EDTA	1 mM
	Tris/HCl pH 8,1	10 mM
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O	
Niedrigsalzpuffer	SDS	0,1%
	Triton X 100	1%
	EDTA	2 mM
	Tris/HCL pH 8,1	20 mM
	NaCl	150 mM
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O	
SDS-Lysepuffer	SDS	1%
	EDTA	10 mM
	Tris/HCL pH 8,1	50 mM
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O + Proteinaseinhibitor (1 Tabl. in 1 ml ddH ₂ O lösen; davon 100 µl pro ml Lysepuffer)	

TE-Puffer	Tris/HCl pH 8,1	10 mM
	EDTA	1 mM
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O	

3.1.9.3 Puffer für *Methylated DNA Immunoprecipitation*

IP-Puffer (10x)	Na-Phosphat pH 7,0	100 mM
	NaCl	1,4 M
	Triton X-100	0,5%
	<i>ad</i> ddH ₂ O	

TE-Puffer	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	<i>ad</i> ddH ₂ O	

<i>Digestionbuffer</i>	Tris pH 8,0	50 mM
	EDTA	10 mM
	SDS	0,5%
	<i>ad</i> ddH ₂ O	

3.1.9.4 Puffer für SDS-PAGE und WesternBlot

Acrylamid /	Acrylamid	292 g
Bis Lösung (30 %)	N`N`-bis-methylen-acrylamid	8 g
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l	

Blockierlösung	Magermilchpulver	5%
	Tween-20	0,1%
	<i>ad</i> PBS (1x)	

FLAG-Lyse-Puffer	Tris HCl pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	1%
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O mit Proteinaseinhibitoren	
Laemmli Puffer (2x)	Tris/HCl pH 6,8	140 mM
	Glycerin	20%
	SDS	4%
	β -Mercaptoethanol	1 M
	Bromphenolblau	0,01%
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O	
PBST	PBS (1x)	
	Tween-20	0,1%
Sammelgelpuffer	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
	<i>ad</i> ddH ₂ O	
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1%
	<i>ad</i> ddH ₂ O	
Transferpuffer (1x)	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20%
	<i>ad</i> ddH ₂ O	

Trenngelpuffer	Tris/HCl pH 8,8 <i>ad</i> ddH ₂ O	1,5 M
----------------	---	-------

3.1.10 Medien

3.1.10.1 Medien zur Kultivierung kompetenter *E. coli* – Stämme

LB-Lennox-Medium	BactoTM Trypton	10 g
	BactoTM <i>yeast extract</i>	5 g
	NaCl	5 g
	D (+)-Glucose-Monohydrat	1 g
Für Kulturplatten	BactoTM Agar	15 g
zusätzlich	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l, autoklavieren	
NZY+ Medium	NZ-Amin (Casein hydrolysat)	10 g
	BactoTM <i>yeast extract</i>	5 g
	NaCl	5 g
	D (+)-Glucose-Monohydrat	3,6 g
	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	2,5 g
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	3 g
	<i>ad</i> 800 ml dH ₂ O auf pH 7,5 mit 3 M NaOH einstellen <i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 1 l, autoklavieren	
SOC-Medium	1 ml steril filtrierte Glucose-Lsg. (2 M)	
	<i>ad</i> SOB-Medium auf ein Endvolumen von 100 ml	

3.1.10.2 Medien zur Kultivierung humaner Zellen

DMEM	DMEM	133,8 g
(10 l)	NaHCO ₃	37 g
	HEPES	59,6 g
	mit HCl auf pH 7,25 einstellen	
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O auf ein Endvolumen von 9 l, autoklavieren	
	<i>ad</i> 50 ml FCS und 5 ml P/S zu 450 ml sterilem DMEM	

RPMI	RPMI	10,43 g
	NaHCO ₃	32 g
	HEPES	50 mM
	<i>ad</i> steriles ddH ₂ O	
	pH 7,25 einstellen und autoklavieren	
	<i>ad</i> 50 ml FCS und 5 ml P/S zu 450 ml sterilem DMEM	

Die Zugabe von Penicillin/Streptomycin-Lösung dient der Unterdrückung von unerwünschtem Bakterienwachstum. Die im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren ermöglichen ein optimales Zellwachstum.

3.1.11 Medienzusätze

3.1.11.1 Antibiotika für *E. coli*

Name	Konzentration der Stocklösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	60 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	170 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml

3.1.11.2 Antibiotika und Zusätze für humane Zellen

Name	Konzentration der Stocklösung	Arbeitskonzentration
Blasticidin	1 mg/ml	5 µl/ml
G418	30000 U/ml	A427: 5 µl/ml HeLa: 20 µl/ml H322: 20 µl/ml
Hydroxycortison	1 mg/ml	1 µl/ml
Insulin	10 mg/ml	0,5 µl/ml
L-Glutamin	200 mM	10 µl/ml
Penicillin/ Streptomycin	100%	1%
FCS	100%	10%
Tetrazyklin	1 mg/ml	5 µl/ml
Zeocin	100 mg/ml	5 µl/ml

3.1.12 Enzyme

<i>DNase I</i> (1 U/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>FastAP</i> , thermosensitiv (1 U/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Proteinase K (20 µg/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>M-MLV</i> Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Promega GmbH, Mannheim
RNase A (10 µg/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
RNasin (RNase A Inhibitor) (40 U/µl)	Promega GmbH, Mannheim
<i>SssI</i> Methyltransferase (20 U/µl)	New England BioLabs, Schwalbach
T4 DNA Ligase (3 U/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	isoliert aus einem <i>Taq</i> -Polymerase exprimierenden <i>E.coli</i> -Stamm (durchgeführt von M. Stein)

3.1.13 Primer

3.1.13.1 Primer für COBRA und Pyrosequenzierung

Tabelle 3-1: Primer für COBRA und Pyrosequenzierung

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge des PCR-Produktes in bp
AATKBSU1	GGTTTGTATGGAAATTAATTTTTTTT	111
AATKBSL1	ATTTATACTAAAACCCAAAACCTACCC	
AATKBIO1*	ATTTATACTAAAACCCAAAACCTACCC	mit AATKBSU1 111
AATKBSU2	GGAGTAGGTTTGTGTGTAAAGTTAGTTATTT	161
AATKBSL2	AAAACCCRAAAACACACCCAAAA	
AATKSeq1	GAGTTTAGTAGTAGAAGTAGT	26
DUSP2BSU2	GGGATTTGTATTTGAGAAGTTGGGTTTT	439
DUSP2BSL2	CCTCCAACCCCATACCACC	
DUSP2BSU1	GTTTTTTTTYGGTGTGTGGTTTT	303
DUSP2BSBIO*	CCTCCAACCCCATACCACC	
DUSP2BSSeq1	TTTTGTTTTTTTTTTAATTTTTTTT	59
DUSP2BSSeq2	GTTTTTTGTTTTGTTTTGTATGGTGTT	50
RASSF5CBSU1	GGTTTTGAGGAATTTGTAGAGGAA	380
RASSF5CBSL1	AAAAAAAATAAACACCCCTCCCC	
RASSF5CBSU2	AGGAAGTGGTTTTAGAATTGTTTTA	323
RASSF5CBSL2	TAAACCCCTAACTCTAAACCCC	
RASSF2BSU1	GATGGAAGGYGTTTTATTTTATTTT	167
RASSF2LBIO*	AAACTAAAACCTACCTCTAAAAAATCC	
RASSF2USEQ	GGGTTTGATAGTTTGGAGAGTGTT	29
RASSF5AU1	GGATAGTTTTGTTAGTTTTGGAGGTATT	363
RASSF5AL1	ACCCTAACCTTCAACCCTACCTCTT	
RASSF5AL2	CTTACCAATCACTTCCCCAACAC	mit RASSF5AU1: 334

Die *Forward*-Primer sind jeweils grau hinterlegt; * 5' Biotin markiert

3.1.13.2 Primer für Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR und qRT-PCR)

Tabelle 3-2: Primer für Reverse Transkriptase PCR

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge des PCR-Produktes in bp
AATKRTF1	TGGCCTGGCTCACTGCAAGTACAG	170
AATKRTR1	CCCAGATGGTCACGCCCAGG	
AATKRTF2	CGCCACGTCCCGCTTCTCC	144
AATKRTR2	GCTCCGGTGACGCCAGCCTTG	
ßACTRTFW	CCTTCCTCCTGGGCATGGAGTC	226
ßACTRTRW	CGGAGTACTTGCGCTCAGGAGGA	
DUSP2RTF1	GCCAGCTGCCCAACCACTTTG	136
DUSP2RTR1	GGCCTCCGCTGTTCTTCACCCA	
chCTCFRTFW	GGCGTAGAGGGGGAAAATGGAGG	197
chCTCFRTRW	GGTGGTGGGGCTGGGGTCAC	
hCTCFRTFW	TTACACGTGTCCACGGCGTTC	365
hCTCF RW	GCTTGTATGTGTCCCTGCTGGCA	
UHE2AB (RASSF1A)	GGCTGGGAACCCGCGGTG	239
L27111 (RASSF1A)	TCCTGCAAGGAGGGTGGCTTCT	
PARGRTF1	ACAGCTTTGATCGATTTCTGGGAT	176
PARGRTR1	TGTTCTGCGACATTGTGATGGA	
RSF2ARTF	TCCTCCAGGGCCCATGTGAGC	237
RSF2ARTR	TGCTGGGGTCTCGGCTATCTCC	
RSF5ARTF	GCACCCTCACCGTGACCTTCAGC	191
RASF5ACRTR	CCGCCGGAGTTTCAGATGCACTT	
RASF5CRTF	TGCAGCCTGGACGAGGAACTGG	252
RASF5ACRTR	CCGCCGGAGTTTCAGATGCACTT	
RASSF10RTF	GCAACCGCGACCACAGCCG	244
RASSF10RTR	GTGGTGCGGCGGGAGAGGC	
TET1RTF1	CCAAGTGTGCTGCTGTGAGGGAA	185
TET1RTR1	CGCTGCCGGACCAAACAAAGAACT	
TET2RTF2	GCAGGAGATGGGCTCAGCAGCA	196
TET2RTR2	TGTCTGGCAAATGGGAGGTGATGG	
Tet2CDRTF1	GCTCATGCCACAGAGACTT	259
Tet2CDRTR1	GGCAAGTCTTGACTGGCTCT	

TET3RTF1	CGCCTCGCAGGGGACAATCC	156
TET3RTR1	CCCCAGACGGCAGTCAATCGCT	
DUSP8RTFW1	CACCCATTGCCCCACCAT	287
DUSP8RTR1	GGTCATAGACCACCACGTCC	
DUSP10RTFW1	CGTCACCACTCATCTTCCCC	236
DUSP10RTR1	TCATGGTCATCCGAGTGTGC	
CTCFCTRTF1	TGGCCGAAAGAGGAAGATGCGC	153
CTCFCTRTR1	GGTGGTGCAGGAGCCTCTGGCT	
CTCFZFRTF1	CGCCGTTCCAACCTGGACCG	149
CTCFZFRTF1	TCTGGGCACTTGTGAGGGCGAG	
BORISRTFW	GGCAAAGGCTTTTCCCGCTGG	201
BORISRTRV	TTCGCGGCTTCCTTCCATCCC	
SUMO1RTF	TCAACTGAGGACTTGGGGGA	265
SUMO1RTR	CCCCCGTTTGTTCCTGATAA	
SUMO2RTF	CGAAAAGCCCAAGGAAGGAGTC	200
SUMO2RTR	TTTCATTGATTGGTTGCCCCTC	
SUMO3RTF	AGGAGGGTGTGAAGACAGAGA	204
SUMO3RTR	GCTGTGCTGGAGTGTCACTT	
SUMO4RTF	CAACGAAAAGCCACAGAAGA	217
SUMO4RTR	TGCAGGTTTGTCTGTTCCA	

Die *Forward*-Primer sind jeweils grau hinterlegt.

3.1.13.3 Primer für Chromatin-Immunopräzipitation

Tabelle 3-3: Primer für Chromatin-Immunopräzipitation

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge des PCR-Produktes in bp
DUSP2CIPU1	TTTGAGGGCCTTTTCCGCTACAAGAG	233
DUSP2CIPL1	GCCTCCGCTGTTCTTACCCAGTC	
DUSP2CIPU2	GGGTGGGCGCAAAAACGGAGGG	236
DUSP2CIPL2	CCGGGGCACCATACAAGGGCAGA	
DUSP2CIPU3	GGCCACGTCACCCTCTCAGTGTCTC	120
DUSP2CIPL3	GCCTCAGCCAAGTTGCCAGACA	

R5CIPCTCFU1	AGCTCCTGCGGCCAGTCCTGC	123
R5CIPCTCFL1	CACCCCCAGCACCTGCCCTTT	
R5CIPKFU3	TGGCGGAAGGTGAAGGGAGAGC	141
R5CIPKFL3	TGCCCTCCCCATGGTAATGAGCA	
R5CIPCTCFU3	TACGCGAGGGGCAGGAAAGGC	135
R5CIPCTCFL3	GCTCGCGCCTCACTCCCTGACT	
AATKCIPU1	TCCCTGTCCCCGTCCCCAAA	285
AATKCIPL1	CGGACGGCAGCACCCCAAGCT	
AATKCIPU3	GGCCTGCCCCCTCCGAGATCTGG	235
AATKCIPL3	GCCCGGCCATGTCGTCGTCC	
AATKCIPU4	CCCCCACCCTCATGCCCTTTG	232
AATKCIPL4	ACTTTGGGCGGGGATGGGGGAT	
AATKCIPU5	GCGGTCTCGTGTGCCCAAGC	168
AATKCIPL5	TTGCGGAAACCCTCAGGCTGC	

Die *Forward*-Primer sind jeweils grau hinterlegt.

3.1.13.4 Primer für *Methylated DNA Immunoprecipitation*

Tabelle 3-4: Primer für *Methylated DNA Immunoprecipitation*

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge des PCR- Produktes in bp
DUSP2CIPU2	GGGTGGGCGCAAAAACGGAGGG	236
DUSP2CIPL2	CCGGGGCACCATAAAGGGCAGA	
DUSP2CIPU3	GGCCACGTCACCCTCTCAGTGTCTC	120
DUSP2CIPL3	GCCTCAGCCAAGTTGCCAGACA	
R5CIPCTCFU3	TACGCGAGGGGCAGGAAAGGC	135
R5CIPCTCFL3	GCTCGCGCCTCACTCCCTGACT	
bACTRTFW	CGGAGTACTTGCCTCAGGAGGA	226
sACTRTRV	CCTTCCTCCTGGGCATGGAGTC	

Die *Forward*-Primer sind jeweils grau hinterlegt.

3.1.13.5 Primer für Promotorklonierung

Tabelle 3-5: Primer für Promotorklonierung

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge des PCR- Produktes in bp
DUSP2BgIIIU1	CAGATCTGAGTGGCTTGGGACAGGTCA	487
DUSP2PromL1	CAGCAGCAGCGTGCGTTCCG	

Die *Forward*-Primer sind jeweils grau hinterlegt.

3.1.13.6 Primer für Mutagenesen

Tabelle 3-6: Primer für Mutagenesen

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')
DUSP2PrDLCTCF1	GCCTTCCTGCTCTGCCCCCGGAGGCCGGCCCACG
DUSP2PrDLCTCR1	CGTGGGCCGGCCTCCGGGGGGGCAGAGCAGGAAGGC
DUSP2PrDLCTCF2	CCCTTAGTCGCTGGTCCCGTGTGGTCCCCGCGCCC
DUSP2PrDLCTCR2	GGGCGCGGGACCAACACGGGACCAGCGACTAAGGG
CTCFMUTK>RS1	CCAACTCTCCTTCAAATGAGGACTGAAGTAATGGAAGGT
CTCFMUTK>RA1	ACCTTCCATTACTTCAGTCCTCATTTGAAGGAGAGTTGG
CTCFSUMO2MutU	CGAAAACATTATAGTAGAAGTAAGGAAAGAACCTGATGCAGAAACAG
CTCFSUMO2MutL	CTGTTTCTGCATCAGGTTCTTCTTACTTCTACTATAATGTTTTCG
CTCFMUTDPARS2	AAAGAGTAAGCTTCGCTACACCAAGGTGGTGGGCAACATGAAAC
CTCFMUTDPARA2	GTTTCATGTTGCCACCACCTTGGTGTAGCGAAGCTTACTCTTT

Die *Forward*-Primer sind jeweils grau hinterlegt.

3.1.13.7 Sequenzierprimer

Tabelle 3-7: Sequenzierprimer

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAGAA
EGFPSeqU	GCCGCCGGGATCACTCTCG
PR0SeqFW	GCAACGCGGCCTTTTACGG
PR0SeqRV	TGTAACCTTGATACTTACCTGCCCA
PCMV	GCGGTAGGCGGTGTACGG

3.1.14 Verwendete siRNA

CTCFHSS	173820 (20 µM Stock)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
CTCFHSS	116456 (20 µM Stock)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
CTCFHSS	116455 (20 µM Stock)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
siCTCF (20 µM Stock)	Wendt <i>et al.</i> 2008, Rotterdam, Holland	
(5'-UCACCCUCCUGAGGAAUCACCUUAA-3')		
siCTCF (20 µM Stock)	J. Leers, Gießen	
(5'-GAUGCGCUCUAAGAAAGAA-3')		
si control (100 µM Stock)	J. Leers, Gießen	
(5'-CUACGAUGAAGCACUAUUATT-3')		

3.1.15 Antikörper

IgG (46540)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA
α-CTCF (07-729)	Millipore, Merck, Darmstadt
α-CTCF-(N2.2)	Hoogenraad <i>et al.</i> , 2000
Histon H3 (1791)	Abcam, Cambridge, MA, USA
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Ziege anti Hase IgG-HRP (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA
GAPDH Hase polyklonal IgG (FL-335)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA
5mC Maus monoklonal (MAb-081-010)	Diagenode, Sparta, NJ, USA
5hmC Maus monoklonal (MAb-31HMC-020)	Diagenode, Sparta, NJ, USA

3.1.16 Vektoren

Tabelle 3-8: Verwendete Vektoren

Vektorname	Resistenz	Hersteller	Bemerkung
pcDNA3	Ampicillin	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	Leervektor
pcDNA3.1 (+)	Ampicillin	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	Leervektor
pCMV-Tag1	Kanamycin	Addgene, Cambridge, England	Leervektor
pEGFP-C2	Kanamycin	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	Leervektor
pGEM [®] -T	Ampicillin	Promega, Heidelberg	Erstvektor
pRLNull	Ampicillin	Promega, Heidelberg	Renilla Luciferase Reporter Vektor
pGL3.1	Ampicillin	Promega, Heidelberg	Luciferase Reporter Vektor
pcMV-Sport6	Ampicillin	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	Leervektor
pcDNA4/TO/ <i>myc</i> -His-A	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	T-Rex-System (enthält zwei Tetrazyklin-Operatoren)
pcDNA4/TO/ <i>myc</i> -His/ <i>lacZ</i>	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt	T-Rex-System (Kontrollvektor, enthält β -Galaktosidase-Gen)
pcDNA3-HA-hBORIS	Ampicillin	AG Renkawitz, Gießen	hBORIS kloniert über <i>Bam</i> HI und <i>Not</i> I
pcDNA3-chCTCF-FLAG	Ampicillin	AG Renkawitz, Gießen	chCTCF kloniert über <i>Eco</i> RI und <i>Xho</i> I
pEGFP-C2-chCTCF- <i>full length</i>	Kanamycin	R. Zhang, Gießen	chCTCF kloniert über <i>Sac</i> I and <i>Eco</i> RI
pEGFP-C2-chCTCF-C	Kanamycin	J. Leers, Gießen	chCTCF Cterm über <i>Eco</i> RI und <i>Xho</i> I aus pGEX4T1avi geschnitten
pEGFP-C2-chCTCF-N	Kanamycin	J. Leers, Gießen	chCTCF Nterm über <i>Eco</i> RI und <i>Xho</i> I aus pGEX4T1avi geschnitten

pEGFP-C2-chCTCF-ZF	Kanamycin	J. Leers, Gießen	chCTCF ZF über <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i> aus pGEX4T1avi geschnitten
pEGFP-C2-chCTCF-ΔSUMO C	Kanamycin	T. Haag, Gießen	Mutation der SUMOylierungsstelle mittels Mutagenese-PCR
pEGFP-C2-chCTCF-ΔSUMO N	Kanamycin	T. Haag, Gießen	Mutation der SUMOylierungsstelle mittels Mutagenese-PCR
pEGFP-C2-chCTCF-ΔPARYL N	Kanamycin	T. Haag, Gießen	Deletion der PARYlierungsstelle mittels Mutagenese-PCR
pcDNA4/TO/ <i>myc</i> -His-A-chCTCF	Ampicillin, Zeocin	D. Streng, Gießen	aus pcDNA3-chCTCF über <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i> kloniert
pRLNull-DUSP2Prom	Kanamycin	T. Haag, Gießen	Promotor-PCR in HF53; Ligation in pGEMT; über <i>BamHI</i> , <i>BglII</i> in pRLNull kloniert
pRLNull-DUSP2PromΔCTCF1	Kanamycin	T. Haag, Gießen	Promotordeletion in CTCF-Bindestelle über Mutagenese PCR
pRLNull-DUSP2PromΔCTCF2	Kanamycin	T. Haag, Gießen	Promotordeletionen in zwei CTCF-Bindestellen über Mutagenese PCR
pCMV-SPORT6-PARG	Kanamycin	U. Schagdarsurengin, Gießen	PARG über <i>EcoRI</i> kloniert
pCMV-TagI-NOREV3(RASSF5C)	Kanamycin	U. Schagdarsurengin, Gießen	Überexpressionsvektor
pCDNA3.1(+)-mAATK	Ampicillin	C. Herkt, Gießen	mAATK kloniert über <i>EcoRI</i> und <i>NotI</i> aus pYX-Asc-mAATK
pEF-hTET2-CD (<i>catalytic domain</i>)	Ampicillin	AG A. Rao, La Jolla, San Diego, USA	TET2-CD mittels <i>Gateway</i> -System in pEF-DEST51 kloniert
pEF-hTET1 <i>full-length</i>	Ampicillin	AG A. Rao, La Jolla, San Diego, USA	hTET1 in pOZ kloniert; über <i>KpnI</i> und <i>XbaI</i> in pEF1 ligiert
pEF-hTET1-CD (<i>catalytic domain</i>)	Ampicillin	AG A. Rao, La Jolla, San Diego, USA	hTET1-CD in pOZ kloniert; über <i>KpnI</i> und <i>XbaI</i> in pEF1 ligiert
pcDNA3-SUMO1-HA	Ampicillin	AG L. Schmitz, Gießen	Überexpressionsvektor
pcDNA3-SUMO2-HA	Ampicillin	AG L. Schmitz, Gießen	Überexpressionsvektor
pcDNA3-SUMO3-HA	Ampicillin	AG L. Schmitz, Gießen	Überexpressionsvektor
pcDNA3-SUMO4-HIS	Ampicillin	AG L. Schmitz, Gießen	Überexpressionsvektor

3.1.17 Chemokompetente *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*)

Tabelle 3-9: Chemokompetente *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Medium	Hersteller
<i>XL10-Gold</i>	TetrD(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacIqZDM15 Tn10</i> (Tetr) Amy Camr].	LB	Stratagene, Agilent Technologies, Frankfurt
<i>TAM I</i>	<i>mcrA</i> D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	LB	Active Motif, Rixensart, Belgien
<i>DH5α</i>	<i>supE44 lacU169 (80lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	LB	ATCC53868

3.1.18 Humane Zelllinien

In die Analysen wurden die nachfolgend aufgeführten Zelllinien einbezogen. Nicht alle Zelllinien wurden in Kultur genommen. Für einen Großteil konnte auf vorhandenes DNA- und RNA-Material zurückgegriffen werden. Die kultivierten Zelllinien sind in Tabelle 3-10 unter Angabe des verwendeten Mediums sowie entsprechender Medienzusätze aufgeführt.

A549	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
A427	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
buf12580 wt	Melanom
CAOV3	Ovarialkarzinom
C8161	Melanom
ES2	Ovarialkarzinom
HTB171	kleinzelliges Lungenkarzinom
FTC133	Follikuläres Thyroidkarzinom
H322	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
H358	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
HaCat	<i>human adult low calcium temperature keratinocytes</i>
HB2	Brustepithelzelllinie
HEK293T	embryonale Nierenzellen
HeLa S3	Zervixkarzinom
Hep2	Epitheliomzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms
Hep2G	Leberkarzinom

HF53	Fibroblasten
HF55	Fibroblasten
HOSE	ovariale Oberflächenepithelzelllinie
IGR1	Metastase von malignem Melanom
MCF-7	Mammakarzinom
MeWo	Melanom
OAW42	Ovarialkarzinom
OVAR	Ovarialkarzinom
Paca 2	Pankreaskarzinom
Patu T	Pankreaskarzinom
RPMI-2650	Plattenepithelkarzinom des nasalen Septums
SKOV-3	Ovar-Adenokarzinom
SKMel13	Melanom
SKMel28	Melanom
TREx293	humane embryonale Nierenzellen, exprimieren stabil den Tet-Repressor
TREx293-chCTCF	humane embryonale Nierenzellen, exprimieren Tetrazyklin-abhängig chCTCF
U209	Sarkom
ZR751	Mammakarzinom
6/53	Sarkom

Tabelle 3-10: Kultivierte Zelllinien mit Angabe des entsprechenden Mediums sowie Medienzusätzen

Zelllinie	Medium (10% FCS und 1% P/S)	Medienzusätze
A427	RPMI	
A459	DMEM	
H322	DMEM	
HB2	DMEM	Hydroxycortison: 1 µl/ml Insulin: 0,5 µl/ml
HEK	DMEM	
HeLa	DMEM	
HF-53	DMEM	
HTB-171	RPMI	
MeWo	DMEM	2 mM Glutamin

TREx293	DMEM	L-Glutamin: 10 µl/ml Blasticidin: 5 µl/ml
TREx293-chCTCF	DMEM	L-Glutamin: 10 µl/ml Blasticidin: 5 µl/ml Zeocin: 5µl/ml chCTCF-Induktion mit 5 µl/ml Tetrazyklin

3.1.19 Primäre Tumore

Für die Untersuchung von Primärtumoren unterschiedlicher Krebsentitäten wurde bereits aufbereitetes DNA-Material verwendet (Lungentumore: Dammann *et al.*, 2001a u. 2005b; Brusttumore: Dammann *et al.*, 2001b; Ovarialkarzinome: Dammann *et al.*, 2010; Merkelzellkarzinome: Helmbold *et al.*, 2009; Phäochromozytome: Dammann *et al.*, 2005b).

3.1.19.1 Primäre Lungentumore

Proben: BZK 1-18 (kleinzellige Lungentumore)

Proben: TA14,TA59,TA74,TA94,TA247 primäres Adenokarzinom

Proben: TS02,TS03,TS12,TS29,TS37,TS41,TS42,TS71 primäres Plattenepithelkarzinom

3.1.19.2 Primäre Brusttumore

Proben: B1 T, B2 T, B3 T, B4 T, B5 T, B6 T, B7 T, B8 T, B9 T, B10 T, B11 T, B12 T
primäres Mammakarzinom

Proben: B4 N, B7 N, B9 N, B10 N, B11 N, B12 N normales Brustgewebe

Die Gewebeproben mit der gleichen Nummer sind Tumorproben (T) und dazugehörige Gewebeproben von nicht verändertem Gewebe (N) einer Patientin.

3.1.19.3 Ovarialkarzinome

Proben: 3,4,6,22,37,43,45,49,51,55,56

3.1.19.4 Merkelzellkarzinome

Proben:

5a,15,20a,21,22b,23,30,31,35,36,38,42,43,46,47,49,50,51,52,54,56,58,60,64,71,73,81,90,91, 94, 95,98,99,100,101,102

Kontrollgewebe (benigne Nävuszellnävi):

NH1,NH6,NH8,NH9,NH10,NH13,NH15,NH18,NH22,NH23,NH27

3.1.19.5 Phäochromozytome

Proben:

45,133,361,600,692,742,872,965,1054,1177,1238,1467,1512,1592,1617,1755,1778,1796,1852, 1857,1881,1884,1887,1919,2053,2106,2115,2225,2324,2338,2348

3.1.20 Vorgefertigte Systeme (Kits)

5hmC TAB-Seq Kit	WiseGene, Chicago,USA
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Micro Bio-Spin 30 Columns	BioRad, München
MSB [®] Spin PCRapace	Invitek GmbH, Berlin
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel GmbH, Düren
NucleoSpin [®] Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel GmbH, Düren
NucleoBond [®] Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH, Düren
PyroMark Q 24	QIAGEN GmbH, Hilden

*(Equipment and Reagents
for Pyrosequencing)*

QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QuickChange Lightning	Promega, Heidelberg
Site-Directed Mutagenesis Kit	

3.1.21 **Gebrauchswaren**

Gewebekulturschale	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Techno Plastic Products AG, Trasadingen
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Handschuhe (rotiprotect Nitril)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging; Menasha, WI, USA
Petrischalen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH, Dreieich Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Plastikwaren	Elkay Laboratory Products, Hampshire, UK Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Sartorius AG, Göttingen Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
PVDF Transfer Membran	GE Healthcare, München
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Sartorius AG, Göttingen
Whatmanpapier	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
PCR-Platte 24 well	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>Strip Caps</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
Zellschaber	Sarstedt, AG & Co, Nümbrecht

3.1.22 **Geräte**

AutoklavTechnoclav	120 Technomara AG, Wallisellen, Schweiz
Blotapparatur	BIO-RAD, München
Blockheater QBD2	Grant Instruments (Cambridge), Ltd. Shepreth, Cambridgeshire, UK

Elektrophoresekammern	PEQlab Biotschnologie GmbH, Erlangen Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Geldokumentation/Transilluminator	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern
Luminometer	SIRIUS, Berthold Detection Systems
Inkubatoren:	
Labor-Brutschrank Typ B6	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Schüttelinkubator TH30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
HERAcell 150	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Gefrierschrank -80°C DF8517	Labotec GmbH, Göttingen
Mikroliterpipetten	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich HTL LAB Solutions
Mikroskope:	
Inverses Mikroskop	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Carl Zeiss GmbH, Jena
Mikrowelle	Cinex Electronic GmbH, Aschenberg
pH-Meter, pH 211	Microprocessor Hanna Instruments, Kehl a.R.
Schüttler/Schwenker:	
Schüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Schwenker Roto-Shake Genie	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y., USA
Thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Thermoshaker TS1	Biometra biomedizinische Analytik GmbH Göttingen
Spektrometer, Gene Quant Pro	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Sonifizierer	Branson Sonifier 250
PCR-Thermo-Cycler:	
Mastercycler Gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Mastercycler	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Rotor-Gene 3000	Corbett Research
Pipetting aid	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich

Wasserbäder:

WB10 P-D	Industriegesellschaft mbH, Dresden
AL-5 Lauda	Dr. R. Wobser GMBH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Waagen:

Acculab Präzisionswaage VIC-123	Sartorius AG, Göttingen
Acculab Präzisionswaage VIC-5101	Sartorius AG, Göttingen
Molecular Imager VersaDoc	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Zentrifugen:

Centrifuge 5418	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Fresco 17 Centrifuge	Heraeus®, Hanau
Multifuge 1S/1S-R	Heraeus®, Hanau
Pico 17 Centrifuge	Heraeus®, Hanau

Zellbank:

MSC-Advantage Biological	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Safety Cabinet	
Magnetrührer (VMS-C7)	VWR International GmbH, Darmstadt
Spannungsgeräte (Power Pac 200)	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt
Pyrosequenzierer PyroMark Q24	QIAGEN GmbH, Hilden
PyroMarkQ24 Vacuum Workstation	QIAGEN GmbH, Hilden
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan GmbH, Grödig, Austria

3.1.23 **Verwendete Software / Datenbanken**

BioEdit Sequence Alignment	Ibis Biosciences, Carlsbad, CA
Editor Version 7.1.3.0	
Phyton vs. COBRA	https://launchpad.net/python.vs.cobra (Dammann, G. <i>et al.</i> , 2011)
PyroMark Q24 Software	QIAGEN GmbH, Hilden
Rotor-Gene 6	Corbett Research, QIAGEN, Hilden

VectorNTI Advanced 11.5	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Genome Studio	Illumina, San Diego, CA 92122 USA
R	The R Foundation for Statistical Computing, Auckland, Neuseeland
CTCFBSDB 2.0	Yan Cui's Lab, University of Tennessee Health Science Center, USA
UCSC Genome Browser	UC Santa Cruz, USA
GraphPad (<i>unpaired t-test calculator</i>)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA

3.1.24 Sterilisation/Autoklavierung von Lösungen und Gebrauchswaren

Alle hitzestabilen Lösungen und Gebrauchsmaterialien wurden bei 120°C und 105 Pascal für 20 Minuten mit heißem Dampf autoklaviert. Lösungen, die hitzeempfindliche Chemikalien beinhalten, wurden steril filtriert. Dabei betrug die Porengröße des Filters 0,22 µm.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit humanen Zellen

3.2.1.1 Zellkultivierung

Die unter Punkt 3.1.18 aufgeführten Zelllinien wurden im empfohlenen Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten mit humanen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärente Zellen, die in Gewebekulturschalen kultiviert wurden und je nach Wachstumsrate kurz vor Erreichen der 100%-Konfluenz mittels Trypsin/EDTA abgelöst und auf neue Schalen ausgesät wurden.

Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in entsprechendem Medium, versetzt mit 10% DMSO, in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff.

3.2.1.2 Herstellung stabiler induzierbarer Zelllinien mit dem T-REx System (*Tet-on*)

Das T-REx System erlaubt es die Expression eines Gens von Interesse gezielt ein- und auszuschalten. Das induzierbare T-REx System von Invitrogen besteht aus dem Cytomegalovirus-Promotor (CMV), einer der stärksten Promotor-Sequenzen in Säugerzellen und zusätzlichen Kontrollelementen des bakteriellen Tetrazyklinresistenz-Operons, die den

Promotor effektiv an- und ausschalten können. Das *Tet-on* T-REx System bedient sich dabei eines Repressors, der die Transkription vom CMV-Promotor in Abwesenheit von Tetrazyklin blockiert. Zwei Tetrazyklin Operator-Sequenzen (TetO2) sind zwischen der TATA-Box des CMV-Promotors und der Transkriptionsstartseite eingefügt. Wenn das Tetrazyklin-Repressor-Protein (TetR) anwesend ist, bindet es an die TetO2-Sequenz und blockiert die Transkription. Nach Zugabe von Tetrazyklin bindet dieses an TetR, ändert dessen Konformation und veranlasst so das Ablösen von der TetO2-Region (Dissertation Roth, 2006; Abbildung 3-1). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System genutzt, um die *chicken* CTCF (chCTCF) Expression gezielt anschalten zu können. Der Vorteil von chCTCF ist, dass es von endogenem CTCF unterschieden werden kann. Es wurde eine Zelllinie von Invitrogen verwendet (TREx293), die den Tet Repressor von dem Vektor pcDNA6TR bereits stabil exprimiert. Da dieser Vektor ein Blastocidin-Resistenz-Gen trägt, muss diese Zelllinie in Blastocidin-haltigem Medium kultiviert werden. In den induzierbaren Expressionsvektor pcDNA4TO wurde chCTCF kloniert (Masterarbeit Streng, 2012). Dieser Vektor enthält neben einem Zeocin-Resistenz-Gen, zwei TetR *operator sites*. Die TREx293 Zellen wurden mit pcDNA4TO-chCTCF transfiziert (Punkt 3.2.1.3 und Tabelle 3-11) und mit Hilfe von Zeocin die Zellen selektioniert, die den Vektor tragen. Zu dem Zeitpunkt, als die Koloniebildung optisch sichtbar war, wurden einzelne Klone isoliert und in 96-er *wells* kultiviert. Bei voller Konfluenz der Zellen wurde auf das nächstgrößere Schalenformat ausgesät. Dieses Prozedere wurde fortgeführt, bis eine Kultivierung in 10-er Schalen möglich war. Die nötige Konzentration an Tetrazyklin für das Induzieren von chCTCF wurde durch Transfektion des Kontrollplasmids pcDNA4/TO/lacZ und anschließendem β -Gal-Assay (Punkt 3.2.1.2.1) bestimmt. Nach Bestimmung der benötigten Tetrazyklinmenge wurden mehrere TREx293-chCTCF-Klone mit Tetrazyklin über unterschiedlich lange Zeiträume induziert und die chCTCF-Expression auf RNA- und Proteinebene kontrolliert. Um die basale Expression von chCTCF durch das im konventionellen Medium enthaltene Tetrazyklin möglichst gering zu halten, wurden die Zellen in Tetrazyklin-reduziertem Medium kultiviert.

Tabelle 3-11: Bedingungen für die Transfektion von TREx293-Zellen mit pcDNA4TO-chCTCF in einer 10 cm Zellkulturschale

Ansatz A		Ansatz B	
Medium	DNA	Medium	Transfektionsreagenz
100 μ l Optimem	4 μ g	100 μ l Optimem	5 μ l PEI

Tabelle 3-12: Verwendete Mengen an Antibiotika zur Kultivierung von TREx293-chCTCF-Zellen bzw. zur chCTCF Induktion

Antibiotikum (Konzentration der Stocklösung siehe 3.1.11.2)	Menge
Zeocin	5 μ l/ml
Blasticidin	5 μ l/ml
Tetrazyklin	5 μ l/ml

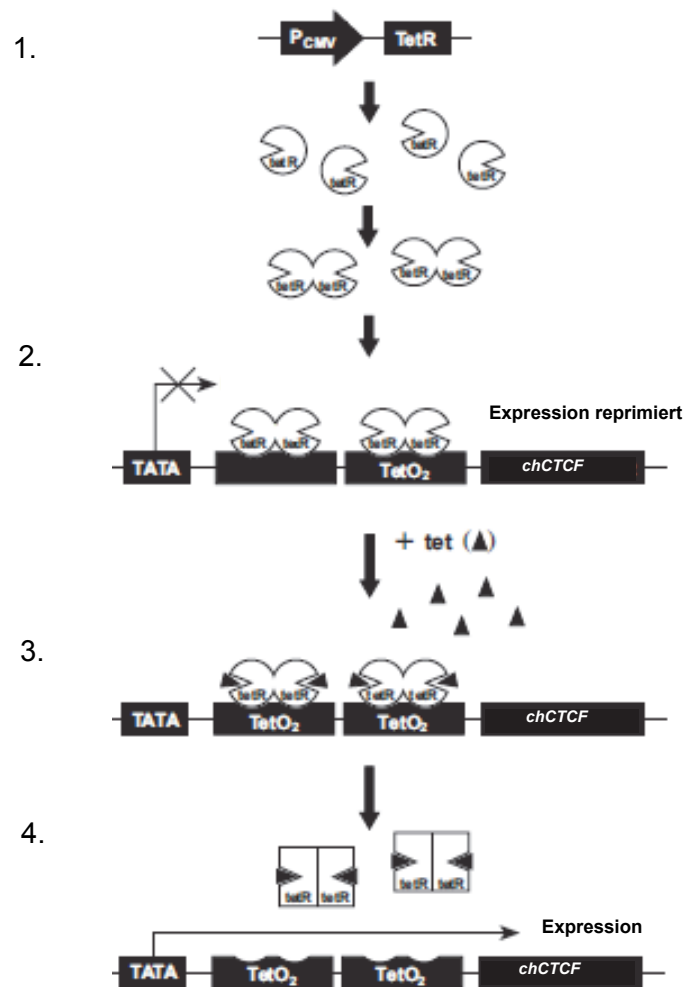


Abbildung 3-1: Prinzip des T-REx-Systems (verändert nach Invitrogen *User Manual*). 1. Das Tet-Repressor Protein (tetR) wird in kultivierten T-REx-Zellen von pCDNA6/TR exprimiert. 2. tetR Homodimere binden im induzierbaren Expressionsvektor an Tet Operator 2 (*TetO₂*) – Sequenzen, was zur Repression von *chCTCF* führt. 3. Nach Zugabe bindet Tetrazyklin (*tet*) an die tetR Homodimere. 4. Die Bindung von *tet* an die tetR Homodimere verursacht eine Konformationsänderung von tetR, die Freilassung von Tet Operator-Sequenzen und die Induktion der *chCTCF* Transkription.

3.2.1.2.1 *β*-Gal-Assay

Wie unter Punkt 3.2.1.2 erwähnt, wurden zur Bestimmung der Menge an Tetrazyklin, die für das Anschalten des T-Rex-Systems und damit zur *chCTCF*-Expression nötig ist, T-REx293-Zellen mit dem Kontrollplasmid pcDNA4/TO/lacZ transient transfiziert (Tab. 3-13) und im Anschluss ein *β*-Gal-Assay durchgeführt. Zusätzlich wurde ein untransfizierter Ansatz mitgeführt. Das im Kontrollplasmid enthaltene LacZ Gen wird als Reporter genutzt, da das Genprodukt *β*-Galactosidase ist. *β*-Galactosidase katalysiert die Hydrolyse von ortho-Nitrophenyl-*β*-D-Galactopyranosid (ONPG), wobei ortho-Nitrophenol entsteht, dessen Gelbfärbung bei 420 nm gemessen werden kann. Der *β*-Gal-Assay wurde gemäß dem Protokoll von Invitrogen durchgeführt. Die Messung bei 420 nm erfolgte im Tecan-Mikroplattenreader. Die Menge an Tetrazyklin, die zur stärksten Gelbfärbung führte bzw. bei einer OD von 420 nm den höchsten Wert ergab (5 µg/ml), wurde zur Induktion von *chCTCF* in den folgenden Experimenten eingesetzt.

Tabelle 3-13: Bedingungen für die Transfektion von TREx293 mit pcDNA/TO/lacZ in einer 3,5 cm-Zellkulturschale

Ansatz A		Ansatz B	
Medium	DNA	Medium	Transfektionsreagenz
100 µl Optimem	4 µg pcDNA/TO/lacZ	100 µl Optimem	5 µl PEI

3.2.1.3 Transfektion humaner Zelllinien

Der Begriff Transfektion beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Unterschieden wird zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der stabilen Transfektion wird die DNA im Gegensatz zur transienten Transfektion ins Wirtsgenom integriert (Jahnson & Rothhämel, 2012). Im Falle einer transienten Transfektion geht das Plasmid somit bei der Zellteilung nach und nach verloren, womit der Effekt des eingebrachten Konstrukts nur über einen relativ kurzen Zeitraum analysiert werden kann. Im Folgenden wird der Ablauf einer transienten Transfektion beschrieben.

Die Zellen sollten für die Transfektion eine Konfluenz von 50-70% aufweisen und auf Serum freies Medium umgestellt werden. Es wurden zwei Ansätze erstellt (Tab. 3-14). Ansatz A enthielt die einzubringende DNA und Medium, Ansatz B das Transfektionsreagenz und Medium. Die beiden Ansätze wurden zusammengefügt, gemischt und 15-20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die tropfenweise Zugabe des Gemischs zu den Zellen, kurzes Schwenken und Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach 6 h wurde auf das Ausgangsmedium umgestellt. Die meisten Transfektionen erfolgten über 48 h. Im Anschluss wurden die Zellen gemäß ihres Verwendungszwecks weiterverarbeitet. Die Kontrolle der Überexpression erfolgte auf RNA-Ebene oder im Falle einer Transfektion mit einem Fluoreszenzvektor (z.B. pEGFP) mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Tabelle 3-14: Bedingungen für die Transfektion humaner Zelllinien in 6-well-Platten bzw. 3,5 cm Zellkulturschalen

	Ansatz A		Ansatz B	
Zellen	Medium	DNA	Medium	Transfektionsreagenz
H322	200 µl Optimem	4 µg	200 µl Optimem	4 µl X-treme Gene HP
HeLa	100 µl 150mM NaCl	3 µg	100 µl 150mM NaCl	6 µl jetPEI
A549	400 µl Optimem	4 µg	400 µl Optimem	4 µl Turbofect
HEK	100 µl Optimem	4 µg	100 µl Optimem	5 µl PEI

3.2.1.4 RNA-Interferenz

Das Prinzip der RNA-Interferenz besteht darin, dass kleine RNA-Moleküle sogenannte siRNAs (*small interfering RNAs*) mit einer Länge von 21 bis 22 nt spezifisch an mRNA binden, was zum Abbau dieser führt (Elbashir *et al.*, 2001). Folglich kann das entsprechende Protein nicht mehr gebildet werden. Diese Tatsache wird in der Molekularbiologie gezielt für die Herunterregulation der Expression (*knockdown*) bestimmter Gene in eukaryotischen Zellen verwendet, indem eine spezifische siRNA eingebracht wird. Für den *Knockdown* von CTCF wurden Zellen mit einer Konfluenz von 60-70% verwendet. Vor der Transfektion wurden die Zellen auf Serum-freies Medium (Optimem) umgestellt. Die unter Punkt 3.1.14 aufgeführten drei CTCF siRNAs CTCFHSS 173820, CTCFHSS 116456 und CTCFHSS 116455 waren bereits gemischt (20 µM Stockkonz.). Von diesem Mix sowie von den anderen beiden CTCF siRNAs (20 µM Stockkonz.) wurden je 1,5 µl in 750 µl Optimem gegeben. Von der höher konzentrierten Kontroll-siRNA (100 µM Stockkonz.) wurden 0,9 µl in 750 µl Optimem aufgenommen. Des Weiteren wurden 1500 µl Optimem mit 24 µl Transfektionsreagenz (Lipofectamin™ RNAimax) versetzt. Dieser Medium-RNAimax-Mix wurde auf den siRNA und den Kontroll-siRNA-Ansatz aufgeteilt, gemixt, 20 min bei RT inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben (je Ansatz ausreichend für drei 3,5 cm *wells*, d.h. 500 µl pro *well*). Nach einer Inkubation von sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde auf das Ursprungsmedium umgestellt und am darauffolgenden Tag die Transfektion wiederholt. Nach insgesamt 96 h erfolgte die Zellernte für die sich anschließende Extraktion von DNA, RNA oder Protein. Der Nachweis eines erfolgreichen *Knockdowns* wurde auf Protein- und RNA-Ebene erbracht.

3.2.1.5 5-Aza-2'-deoxycytidin- / 3-Aminobenzamid-Behandlung

5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) ist ein Methyltransferase-Inhibitor, der nach der Zellteilung eine *de novo*-Methylierung verhindert (Jones *et al.*, 1983). In der Folge führt dies dazu, dass durch Promotor-Hypermethylierung inaktivierte Gene aufgrund der fehlenden Methylierung reaktiviert werden.

Für die 5-Aza-dC-Behandlung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (5 µM, 10 µM 5-Aza-dC) über vier Tage kultiviert. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden alle 24 Stunden mit dem Reagenz versetzt, wobei das Medium jeweils gewechselt wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,5x PBS gewaschen, geerntet und entsprechend ihres Verwendungszwecks weiterverarbeitet.

Die Inhibition der PARylierung wurde durch den Einsatz von 3-Aminobenzamid (3-ABA) herbeigeführt. Dieser PARP- Inhibitor blockiert durch Bindung das katalytische Zentrum des Enzyms Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1).

3-ABA wurde, in Anlehnung an die Publikation von Witcher & Emerson 2010, in einer Endkonzentration von 5 mM über einen Zeitraum von 24 h eingesetzt. Da sich 3-ABA nicht in H₂O löst, wurde ein 1:9 DMSO-ddH₂O-Gemisch verwendet. Im Zellkultur-Kontrollansatz wurde dieses Mischverhältnis ebenfalls verwendet.

3.2.2 Colony Formation Assay

Der *Colony Formation Assay* erlaubt es, eine Aussage über die tumorsuppressorische Wirkung eines Gens treffen zu können. Dafür werden Tumorzelllinien mit inaktivem methyliertem Promotor mit dem zu untersuchenden mutmaßlichen Tumorsuppressorgen transfiziert, wobei jeweils der zugehörige Leervektor als Kontrolle ebenfalls transfiziert wird. Über eine G-418 Selektion wird sichergestellt, dass nur transfizierte Zellen überleben. Anschließend werden die sich gebildeten Kolonien gefärbt und ausgezählt.

Für den Assay wurden H322, HeLa oder A427-Zellen verwendet. Transfiziert wurde bei einer Konfluenz der Zellen von 25% in Triplikaten plus einem Ansatz, der für die RNA-Isolation verwendet wurde. Die Transfektion wurde in 6-well-Schalen durchgeführt. Die Transfektionsbedingungen sind in Tabelle 3-15 aufgelistet. Ein Tag nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und mit der G418-Selektion begonnen (Mengen siehe Tabelle 3-15). Anschließend wurden die transfizierten Zellen für ungefähr drei bis vier Wochen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt, um tote Zellen zu entfernen. Bei optischer Sichtbarkeit der Koloniebildung wurde eine Giemsa-Färbung durchgeführt. Die ca. fünfminütige Färbung der Kolonien mit einer 1:10-verdünnten Färbelösung erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS und einer Trocknung für 10 min. Danach wurde die Färbelösung abgenommen, die Zellen erneut gewaschen und getrocknet sowie die Kolonien ausgezählt. Je ein well der beiden Ansätze wurde, wie bereits erwähnt, nicht mit der Färbelösung behandelt, sondern für eine RNA-Isolation und nachfolgende Expressionsanalyse verwendet, um die Überexpression zu kontrollieren.

Tabelle 3-15: Bedingungen für die Transfektionen und G-418 Selektion im Rahmen der *Colony Formation Assays*

Zelllinie	DNA	Transfektionsreagenz	G-418 (30000 U/ml)
HeLa	1 µg	12 µl jetPEI	20 µl/ml
H322	1 µg	4 µl TurboFect	20 µl/ml
A427	1 µg	4 µl HP9	5 µl/ml

3.2.3 Präparation von DNA und RNA

3.2.3.1 Isolation genomischer DNA aus Zelllinien

Vor der eigentlichen DNA-Isolation wurde das Zellmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mittels fünfminütiger Inkubation mit 1 ml Trypsin bei 37°C von der Kulturplatte abgelöst. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zum proteolytischen Verdau der Proteine wurde mit Proteinase K inkubiert. Hierzu wurden die Zellen mit 400 µl Proteinase K-Puffer und 15 µl Proteinase K (Stock 20 mg/ml) versetzt, die Suspension gevortext und über Nacht bei 55°C inkubiert. Die sich anschließende Extraktion der DNA wurde wie nachfolgend dargestellt durchgeführt:

- Zugabe von 500 µl Phenol, 1 min per Hand stark mischen, bei 13000 rpm 3 min zentrifugieren
- Zugabe von 500 µl Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Mix (25/24/1) zur oberen wässrigen Phase, 1 min per Hand mischen, bei 13000 rpm 3 min zentrifugieren
- Zugabe von 500 µl Chloroform zur oberen wässrigen Phase, 1 min mischen, bei 13000 rpm 3 min zentrifugieren
- DNA-Fällung: Obere Phase (ca. 350 µl) mit 1/10 Vol 5 M NaAc (35 µl) und 1 Vol 100% Isopropanol (350 µl) mischen, bei 13000 rpm 10 min zentrifugieren; Pellet mit 150 µl 70%-igem EtOH 1x waschen
- EtOH möglichst vollständig abnehmen, Pellet ca. 5-10 min lufttrocknen
- Pellet in 30 µl TE-Puffer durch Anschnipsen des Tubes resuspendieren
- Zugabe von 2 µl RNase (Stock 10 mg/ml), Inkubation bei 37°C 10 min
- Konzentrationsbestimmung

3.2.3.2 Isolation von RNA aus Zelllinien

Vor Beginn der RNA-Isolation wurde das Zellmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml RNA-Lysis-Reagenz und das Überführen der Zellsuspension in ein 2 ml-Reaktionsgefäß. Die Arbeitsschritte der RNA-Isolation sind nachfolgend aufgeführt:

- Zugabe von 200 µl Chloroform, vortexen
- 10 min bei 11000 rpm zentrifugieren
- obere Phase in neues Eppendorfgefäß überführen; Zugabe von 500 µl Isopropanol (100%), vortexen
- 10 min bei 11000 rpm zentrifugieren
- Waschen des RNA-Pellets mit 150 µl 70%-igem EtOH (verdünnt mit DEPC-H₂O)
- 10 min bei 11000 rpm zentrifugieren
- EtOH abnehmen, Pellet lufttrocknen
- RNA-Pellet in 20 µl DEPC-H₂O aufnehmen
- Konzentrationsbestimmung; Verdünnung der RNA mit DEPC-H₂O auf 500 ng

DNase-Behandlung der RNA:

Dazu wurden 2 µg RNA zusammen mit 1 µl DNase, 1 µl RNase-Inhibitor (Ribolock), 2 µl DNase-Puffer sowie 5 µl DEPC-behandeltem H₂O für 30 min bei 37°C und 10 min bei 65°C inkubiert.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe eines Mikroplatten Readers bestimmt. Dabei entspricht gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz eine OD von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 40 ng/µl für einzelsträngige und 50 ng/µl für doppelsträngige Nukleinsäuren. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Bildung des Quotienten der Absorptionskoeffizienten von 260 nm und 280 nm erlaubt den Rückschluss auf den Grad

der Verunreinigung der Nukleinsäurelösung mit Proteinen. Optimaler Weise sollte der Wert für DNA zwischen 1,8 und 2,0 und für RNA zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Für die Messung wurden 2 µl DNA bzw. RNA eingesetzt. Als Referenz wurde gegen die Lösung gemessen, in der das jeweilige DNA-bzw. RNA-Material gelöst wurde.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe zu trennen. Die Nukleinsäuren wandern bei der Agarose-Gelelektrophorese aufgrund der negativen Ladung ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates zur Anode und werden durch die Agarose anhand ihrer Größe und Konformation aufgetrennt. Bis 50 kb verläuft die Größenauftrennung logarithmisch. Steigt die Basenanzahl an, wird die Beweglichkeit der Nukleinsäuren und damit die Wanderungsgeschwindigkeit verringert. Für Fragmente bis 500 bp wurden 2%-ige Agarosegele; für Fragmente zwischen 0,5 kb und 7 kb 1%-Agarosegele verwendet. Für alle Agarose-Gelelektrophoresen, ausgenommen der zur Überprüfung der Sonifikation, wurde TBE-Puffer verwendet. Die Kontrollgelelektrophorese im Anschluss an die Sonifikation wurde in TAE-Puffer durchgeführt, um eine bessere Auftrennung zu ermöglichen. Zur Herstellung der Gele wurde je nach Prozentigkeit des Gels, die entsprechende Menge Agarose mit 100 ml 0,5x TBE oder TAE-Puffer aufgekocht. Im Anschluss wurde die Lösung mit 3 µl einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung versetzt und in einen mit Kämmen ausgestatteten Gelschlitten gegossen. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA/RNA und es bilden sich DNA/RNA-Ethidiumbromid-Komplexe, die als eine rot/orange Fluoreszenz im UV-Licht bei 254-300 nm detektiert werden können. Vor dem Beladen des auspolymerisierten Gels wurden die zu analysierenden Proben mit Ladepuffer versetzt. Um die Produktgröße der aufgetrennten Fragmente bestimmen zu können, wurde bei jedem Gel ein Längenstandard (Marker) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte in 0,5x TBE oder TAE-Puffer bei einer Spannung von 130-200 Volt.

3.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.2.6.1 Allgemein

Die PCR-Technik ist eine enzymatische Methode für die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Saiki *et al.*, 1988). Die Spezifität dieser Amplifikation basiert auf zwei Oligonukleotidprimern, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren und nach einer Hitzedenaturierung an den komplementären Strängen binden. Die hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* (Chien *et al.*, 1976) synthetisiert bei ihrer optimalen Temperatur von 72°C die DNA entlang der Region zwischen den Primern. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer (*Annealing*) und DNA-Synthese (Elongation) wird eine potentielle Vermehrung des jeweiligen DNA-Fragmentes erreicht. Durch den Einsatz der hitzestabilen *Taq*-Polymerase wird die Automatisierung der PCR in Thermocyclern ermöglicht. Die Reaktionsbedingungen müssen für jedes Primerpaar individuell optimiert

werden. Variationen betreffen hierbei vor allem die *Annealing*-Temperatur, die Magnesiumchlorid-Konzentration sowie die Konzentration von Formamid, eine Substanz, die die Primerspezifität erhöht. Bei allen PCRs wurde eine H₂O-Kontrolle mitgeführt. Die PCR-Produkte wurden für nachfolgende Analysen nur weiterverwendet, wenn die zugehörige H₂O-Kontrolle keine Kontamination aufwies. Zum Einsatz kam die PCR-Technik im Rahmen von Klonierungen, Chromatin-Immunopräzipitation, *Methylated-DNA-Immunoprecipitation*, *Combined Bisulfite-Restriction-Analysis*, Pyrosequenzierung, RNA-Expressionsanalysen sowie Mutagenesen.

3.2.6.2 Realtime PCR (quantitative PCR)

Die *Realtime* PCR basiert auf demselben Prinzip wie die konventionelle PCR (siehe Punkt 3.2.6.1). Der Vorteil ist, dass eine direkte Quantifizierung der hergestellten PCR-Produkte ermöglicht wird, da die Amplifikation in Echtzeit aufgezeichnet wird. Dies wird durch den der Reaktion zugesetzten Farbstoff *SYBR Green*, der in die DNA interkaliert, ermöglicht. Dieser fluoreszierende Farbstoff hat sein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 494 nm, sein Emissionsmaximum liegt bei 521 nm. Die Quantifizierung des PCR-Produktes erhält man über die Detektion von *SYBR Green* durch Messung der Fluoreszenzabnahme während der Elongationsphasen über die gesamte PCR-Reaktion hinweg.

3.2.7 Methylierungsanalysen

3.2.7.1 In vitro DNA-Methylierung

In vitro methylierte genomische DNA wurde als Positivkontrolle im Rahmen der Methylierungsanalysen eingesetzt. Des Weiteren wurde das *DUSP2*-Promotorkonstrukt, das für den Luciferaseassay verwendet wurde, *in vitro* methyliert. Für die *in vitro* DNA-Methylierung wurde die *SssI* Methyltransferase verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Methylierung der Cytosin-Basen an der C5-Position des Pyrimidinrings, wenn sich das Cytosin innerhalb der doppelsträngigen Dinukleotiderkennungssequenz 5'-CpG-3' befindet. Die Durchführung der *in vitro* Methylierung gestaltete sich gemäß folgendem Protokoll:

- 20 µg DNA (x µl) mit 20 µl Buffer 2, 1 µl SAM 200x (Donor der Methylgruppe), 15 µl *SssI* (4 U/µl) und (164-x) µl H₂O versetzen
- Inkubation bei 37°C über Nacht, wobei nach 2-3 h zusätzlich 1 µl SAM zugegeben wird
- Zugabe von 100 µl TE-Puffer
- Phenol/ Chloroform-Extraktion:
- Zugabe von 300 µl Phenol/Chloroform-Mix (25:24:1), nach 2-3 min Mischen, Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm
- Zugabe von 300 µl Chloroform zur oberen wässrigen Phase; nach 2-3 min Mischen, Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm

- DNA-Fällung:
obere wässrige Phase mit 30 µl NaAC (3 M, pH 5,2) und 750 µl 100%-igem EtOH mischen und 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Waschen des Pellets mit 100 µl 70%-igem EtOH, Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm
- Trocknen des Pellets und Aufnahme in 20-30 µl H₂O
- Konzentrationsbestimmung

Die *in vitro* Methylierung von Plasmiden wurde im Anschluss durch Restriktion mit den Isoschizomeren *HpaII/MspI* überprüft. Hierbei wird sich zur Nutze gemacht, dass diese Enzyme die gleiche Sequenz erkennen und spalten, *HpaII* aber methylierungssensitiv ist und im Gegensatz zu *MspI* keine methylierte DNA schneidet.

3.2.7.2 Bisulfit-Behandlung der DNA

Mit Hilfe der Bisulfittechnik ist es möglich, das Methylierungsmuster von DNA-Sequenzen zu analysieren. Ausgenutzt wird die Tatsache, dass einzelsträngige Cytosine durch katalytische Wirkung von Bisulfit hydrolytisch zu Uracilen deaminiert werden (Abbildung 3-2). Methylierte Cytosine werden hingegen nicht umgewandelt und bleiben als Cytosine erhalten. Somit wird die Unterscheidung von unmethylierten Cytosinen (zu Uracilen deaminiert) und 5-Methylcytosinen in der Sequenzabfolge ermöglicht. Eine anschließende PCR führt dazu, dass die Uracile durch Thyminen ersetzt werden (Lottspeich, 2006). Zum Nachweis der methylierten Cytosine und der zu Thyminen umgewandelten Cytosine wurden die *Combined Bisulfit-Restriction-Analysis* (COBRA) und die Pyrosequenzierung genutzt.

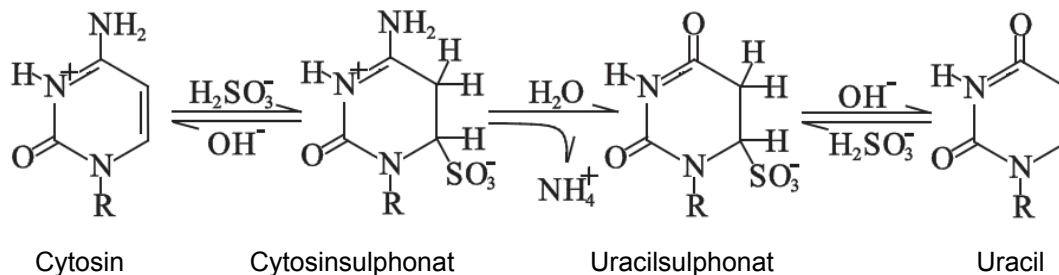


Abbildung 3-2: Chemischer Ablauf der Bisulfit-Reaktion. Im ersten Schritt erfolgt die Sulphonierung des Cytosins zum Cytosinsulphonat. Im zweiten Schritt deaminiert Cytosinsulphonat zu Uracilsulphonat, von dem anschließend die Sulphonsäuregruppe hydrolytisch abgespalten wird (verändert nach Shapiro *et al.*, 1973).

Die Durchführung der Bisulfit-Behandlung erfolgte wie nachfolgend aufgeführt:

- Zugabe von (18-x) µl TE-Puffer und 2 µl 3 M NaOH zu 2 µg (x µl) DNA
- Inkubation bei 37°C für 10 min
- Zugabe von 208 µl Sodium-Bisulfit-Lösung (3,6 M; pH 5,5) und 12 µl Hydrochinon-Lösung (0,1 M), mischen
- Inkubation für 15-17 h bei 56°C
- die Bisulfit-behandelte DNA wurde mittels MSB[®] Spin PCRapace von Invitex aufgereinigt und in 50 µl ddH₂O eluiert

- zur Abtrennung der Schwefelgruppe 5 µl 3 M NaOH zufügen und 10 min bei 37°C inkubieren
- DNA-Fällung: Zugabe von 1 µl (1 µg) Glykogen, 55 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 275 µl 100%-igem EtOH, vortexen, schütteln; Fällung für 20 min bei -20°C
- Zentrifugation 10 min bei 13000 rpm
- das Pellet mit 100 µl 70%-igem EtOH waschen, anschließend 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- nach Abnahme des Überstandes erfolgt das Trocknen des Pellets
- Aufnahme und Lösen des Pellets in 30 µl ddH₂O oder TE-Puffer

3.2.7.3 *Combined Bisulfite-Restriction-Analysis (COBRA)*

Die COBRA-Methode diente der Analyse des Methylierungsstatus von Promotorbereichen der zu untersuchenden Gene. Hierbei wird die Bisulfit-behandelte DNA zunächst mit Primern, die spezifisch an den zu untersuchenden Promotorbereich binden, amplifiziert und im Anschluss mit Restriktionsenzymen geschnitten, die ein CpG in ihrer Erkennungssequenz (Palindrom) besitzen. Ein in der Sequenz enthaltenes unmethyliertes Cytosin wird während der Bisulfitbehandlung und der nachfolgenden PCR durch ein Thymin ersetzt. Daraus resultiert eine Veränderung der Erkennungssequenz, was wiederum dazu führt, dass das Restriktionsenzym nicht mehr schneiden kann. Methylierte Cytosine hingegen bleiben während der Bisulfitbehandlung und der PCR erhalten und werden während der Restriktion aufgrund der unveränderten Erkennungssequenz geschnitten.

Der Erfolg der mit der Bisulfit-behandelten DNA durchgeführten PCRs wurde jeweils mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, bevor zur Restriktion mit dem entsprechenden Restriktionsenzym übergegangen wurde.

Im Folgenden sind der grundlegende PCR-Ansatz, das Basis-PCR-Programm sowie die variablen Reaktionsbedingungen für alle im Rahmen der COBRA durchgeführten PCRs zusammengefasst. Variable Parameter sind Tabelle 3-16 zu entnehmen.

PCR-Programm:

- | | | |
|--------------------------|-------|------------|
| 1. T = 95°C | 2 min | |
| 2. T = 95°C | 30 s | |
| 3. T = T _A °C | 50 s | } x Zyklen |
| 4. T = 72°C | 50 s | |
| 5. T = 72°C | 4 min | |
| 6. end | | |

PCR- Ansatz:2,5 µl NH₄-Puffer (10x)

2 µl dNTPs (2,5 mM)

x µl MgCl₂ (50 mM)x µl *Forward*-Primer (10 pmol/µl)x µl *Reverse*-Primer (10 pmol/µl)0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)

x µl Formamid

x µl Bs-DNA bzw. Produkt aus 1.PCR bei *nested* und *semi-nested* PCRsx µl H₂O

25 µl Gesamtvolumen

Um ausreichend Produkt zu erhalten, wurden für *DUSP2* und *RASSF5C* *semi-nested* bzw. *nested* PCRs durchgeführt.

Tabelle 3-16: Parameter für die COBRA-PCRs

Gen	MgCl ₂ in µl	<i>Forward</i> - Primer in µl	<i>Reverse</i> - Primer in µl	Formamid in µl	Template in µl	<i>Annealing</i> - Temp. (T _A) in C°	Zyklen (x)	Länge des PCR- Produktes in bp
<i>AATK</i> (Region abwärts vomTS)	1	1	1	1	2	54	46	111
<i>AATK</i> (Region aufwärts vom TS)	1,5	1	1	0	2	56	48	161
<i>DUSP2</i> 1.PCR	1,5	1	1	0	5	57	20	439
<i>DUSP2</i> 2.PCR	1,5	1	1	0	1	56	35	303
<i>RASSF2</i>	1	2	2	0,5	3	57	50	167
<i>RASSF5C</i> 1.PCR	0,75	1	1	0,5	3	53	35	380
<i>RASSF5C</i> 2.PCR	0,75	1	1	0	2	50	25	323
<i>RASSF5A</i> 1.PCR	0,75	1	1	0	2	56	25	363
<i>RASSF5A</i> 2.PCR	0,75	1	1	0,5	1	56	25	334

Für die Restriktion wurde *TaqI* (5'-TCGA-3') mit 10 Units (Endkonzentration) und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Neben dem eigentlichen Restriktionsansatz wurde jeweils ein *mock*-Verdau (Scheinverdau ohne Enzym) mitgeführt, um nach elektrophoretischer Auftrennung im direkten Vergleich den Methylierungsstatus erfassen zu können.

Restriktionsansatz:

0,5 µl Restriktionsenzym
1 µl Puffer (10x)
5 µl PCR- Produkt (50-100 ng)
3,5 µl H₂O

mock-Ansatz:

1 µl Puffer (10x)
5 µl PCR- Produkt (50-100 ng)
4 µl H₂O

Bei schwachen PCR-Produkten wurde der Restriktionsansatz verdoppelt, d.h. es wurden 10 µl PCR-Produkt (100-200 ng) eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde für eine Stunde bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurden sowohl der Restriktionsansatz als auch der *mock*-Ansatz mit 5 µl Orange G versetzt und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Die Fragmentgrößen der PCR-Produkte nach *TaqI*-Restriktion sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3-17: Fragmentgrößen nach *TaqI*-Verdau

Gen	Fragmentgrößen nach <i>TaqI</i> -Verdau
<i>AATK</i> (Region abwärts vom TS)	79 bp, 32 bp
<i>AATK</i> (Region aufwärts vom TS)	94 bp, 67 bp
<i>DUSP2</i>	149 bp, 60 bp, 51 bp, 43 bp
<i>RASSF5C</i>	220 bp, 64 bp, 39 bp
<i>RASSF5A</i>	26 bp, 74 bp, 94 bp und 140 bp
<i>RASSF2</i>	111 bp, 56 bp

3.2.7.4 Pyrosequenzierung

3.2.7.4.1 Allgemein

Die Pyrosequenzierung ist eine relativ neue Methode zur DNA-Sequenz-Analyse. Sie beruht auf der Detektion des während der DNA-Synthese freiwerdenden Pyrophosphats (PPi). Die biotinylierten Einzelstränge der PCR-Produkte werden zunächst mit Streptavidin-Sepharose-Kügelchen von den nicht-biotinylierten getrennt und in der folgenden Sequenzreaktion als Vorlage genutzt. Nach der Bindung eines Sequenzierprimers erfolgt eine Elongation entlang des *Template*-DNA-Stranges durch eine DNA-Polymerase. Dabei werden die vier Desoxynukleotidtriphosphate dATP α S, dCTP, dGTP und dTTP nacheinander zum einzelsträngigen *Template* und dem Primer zugegeben. Liegt die komplementäre Base auf

dem Matrizenstrang, katalysiert die DNA-Polymerase den Einbau des Nukleotids. Im Falle eines Einbaus wird PPi freigesetzt. Die Sulfurylase setzt das PPi in Anwesenheit von Adenosinphosphosulfat (APS) quantitativ zu ATP um. Dieses ATP veranlasst die durch die Luciferase katalysierte enzymatische Umsetzung von Luciferin zu Oxiluciferin. Bei dieser Umsetzung entsteht im proportionalen Verhältnis zum ATP-Gehalt sichtbares Licht (Abbildung 3-3). Dieses wird dann über einen Detektor erfasst und im Pyrogramm dargestellt. Somit ist jedes Lichtsignal proportional zu der Anzahl eingebauter Nukleotide. Nicht eingebaute Nukleotide und überschüssiges ATP werden während der Reaktion von der Apyrase degradiert (Masterarbeit Haag, 2010).

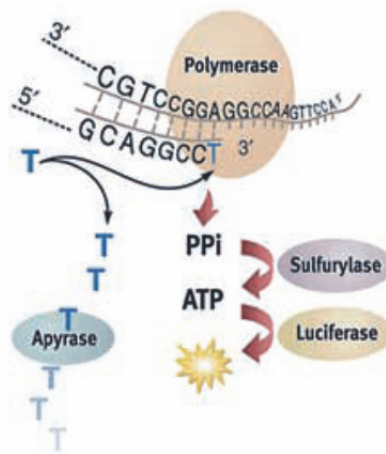


Abbildung 3-3: Prinzip der Pyrosequenzierung. Das zur Verlängerung des Sequenzierprimers jeweils einzubauende Nukleotid (T) liegt nicht im Reaktionsansatz vor, sondern wird einzeln hinzugegeben. Das anschließend beim Nukleotideinbau freigesetzte Pyrophosphat (PPi) aktiviert eine enzymatische Kaskade, die zur Generierung eines Lichtblitzes führt, dessen Stärke direkt proportional der Menge an eingebautem Nukleotid ist. Bevor das nächste Nukleotid hinzukommt, baut die Apyrase überschüssiges Nukleotid ab (Lehmann, 2008).

3.2.7.5 DNA Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung

Die kombinierte Anwendung aus DNA-Bisulfit-Konvertierung und Pyrosequenzierung wurde als weitere Technik neben der COBRA-Methode eingesetzt, um den Methylierungsgrad quantitativ zu bestimmen. Von Vorteil ist hierbei, dass der Methylierungsgrad einzelner CpG-Dinukleotide ermittelt werden kann. Die Besonderheit bei dieser Methylierungsanalyse der durch Bisulfit veränderten DNA-Sequenz ist, dass in der Abfolge der injizierten Nukleotide nach einem dCTP immer ein dTTP folgt, wobei ein Lichtsignal durch dCTP auf eine ursprünglich methylierte Cytosin-Base hinweist. Ein Lichtsignal durch dTTP weist hingegen auf eine ursprünglich unmethylierte Cytosin-Base hin. Aufgrund der Proportionalität der Lichtsignale zur Anzahl der eingebauten Nukleotide kann das Peakverhältnis dieser beiden Signale genutzt werden, um den Methylierungsgrad des betreffenden Cytosins in Prozent zu ermitteln (Masterarbeit Haag, 2010).

3.2.7.6 Durchführung der Pyrosequenzierung

3.2.7.6.1 PCR mit biotinylierten Primern

Die Bisulfit-behandelte DNA wurde zunächst mit biotinylierten Primern, die spezifisch an den zu untersuchenden Promotorbereich binden, amplifiziert. Es wurden dieselben *upper* Primer verwendet, wie bei den COBRA-Analysen. Die *lower* Primer unterscheiden sich hinsichtlich der Sequenz ebenfalls nicht, tragen aber eine Biotin-Markierung am 5'-Ende. Die PCR-Bedingungen entsprechen demnach, denen der COBRA und sind Tab. 3-16 zu entnehmen.

Im Anschluss an die PCR wurden 5 µl des Produkts elektrophoretisch aufgetrennt, um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen.

3.2.7.6.2 DNA-Einzelstrangseparation

Zunächst wurden die Biotin-markierten PCR-Produkte separiert und aufgereinigt. Die Vorgehensweise stützte sich dabei auf die PyroMark Q24-Anleitung. Gemäß dem zuvor mit Hilfe der PyroMark Q24 Software erstellten Pipettierplan wurden jeweils 5-10 µl PCR-Produkt in die Vertiefung einer 24-*well* Platte vorgelegt. Im Anschluss wurden je *well* 40 µl *Binding Buffer*, 2 µl Streptavidin-Sepharose und 33 µl bzw. 28 µl ddH₂O dazugegeben. Für die H₂O-Kontrolle und die Sequenzierprimer-Kontrolle wurde kein PCR-Produkt und entsprechend mehr ddH₂O verwendet. Für die Oligo-Kontrolle wurden 25 µl Kontroll-Oligo (0,04 µM) und 13 µl ddH₂O sowie die oben angegebenen Mengen *Binding-Buffer* und Sepharose in ein *well* gegeben. Die 24-*well*-Platte wurde mit den *strip caps* verschlossen und bei 22°C schüttelnd (1400 rpm) inkubiert. Hierbei kommt es zur Immobilisierung biotinylierter DNA über eine Streptavidin-Bindung an die Sepharose-Kügelchen. Anschließend wurden mit Hilfe der PyroMark Q24 *Vakuum Workstation* die DNA-Einzelstränge präpariert. Nach dem Anschalten des Vakuums wurde der Filterträger des Handgerätes für etwa 20 sec. in die 24-*well*-Platte getaucht und die PCR-Suspension angesaugt. Nach kurzem Senkrecht halten des Handgerätes erfolgte durch Eintauchen in 70%-igen Ethanol für ca. 10 sec. das Waschen der Filterträger. Im Anschluss wurden die Filterträger in Denaturierungs-Lösung (*Denaturation Solution*) gehalten, wodurch die an die Filterköpfe angesaugten DNA-Doppelstränge denaturiert wurden. Danach folgte die Reinigung in Waschpuffer (*Wash Buffer*). Zu diesem Zeitpunkt lagen die biotinylierten DNA-Einzelstränge gebunden an Streptavidin-Sepharose an den Filterköpfen vor. Nicht biotinylierte komplementäre DNA-Stränge wurden durch die Behandlung eliminiert. Die Kügelchen wurden nachfolgend durch Abschalten des Vakuums in eine flache 24-*well*-Platte freigesetzt, die je Vertiefung 25 µl Sequenzierprimer (0,3 µM) bzw. bei der H₂O- und der Oligo-Kontrolle 25 µl *Annealing-Buffer* enthielt. Zum Abfallen der Kügelchen wurde das Handgerät mit den Filterträgern einige Minuten gerüttelt. Dieser Ansatz wurde für 2 min bei 80°C auf einem Heizblock und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies diente der Hybridisierung des Sequenzierprimers an die komplementäre DNA-Sequenz (Masterarbeit Haag, T., 2010).

3.2.7.6.3 Pyrosequenzierungs-Reaktion

Die dem System zugehörige Patrone wurde mit den entsprechenden Mengen (gibt die Software nach Erstellung des Assays an) der dNTPs, des Enzym- und des Substratmixes befüllt und zusammen mit der PCR-Platte im Pyrosequenzierer platziert. Im Anschluss wurde das zuvor erstellte und geladene Programm gestartet.

Die Auswertung der Pyrosequenzierung erfolgte mit Hilfe der PyroMark Q24 Analysis Software.

3.2.7.7 *Tet-assisted bisulfite sequencing (TAB-Seq)*

Das *Tet-assisted bisulfite sequencing* (TAB-Seq) ermöglicht es, neben 5-Methylcytosin (5mC) auch 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) zu erfassen, was mit traditioneller Bisulfitbehandlung nicht möglich ist. Diese relativ neue Technik musste zunächst im Labor etabliert werden. Ausgenutzt wird bei dieser Methode, dass TET-Proteine nicht nur 5mC zu 5hmC, sondern 5hmC auch weiter zu 5-Carboxylcytosinen (5caC) oxidieren. Des Weiteren weist 5caC nach Bisulfitbehandlung ein ähnliches Verhalten wie unmodifizierte Cytosine (C) auf. Dieser Desaminierungs-Unterschied zwischen 5caC und 5mC/5hmC unter Bisulfit-Bedingungen wird sich beim TAB-Seq zur Nutze gemacht. Im ersten Schritt wird durch Einsatz von *β-Glucosyltransferase* (*βGT*) *β*-Glucosyl-5-Hydroxymethylcytosin (5gmC) generiert, um 5hmC vor der nachfolgenden Oxidation durch rekombinantes Tet1 Protein zu schützen. mTet1-Oxidation führt zur Konvertierung von 5mCs zu 5caCs, während die geblockten 5hmCs nicht modifiziert werden. Sich anschließende Bisulfitbehandlung und PCR-Amplifikation der zu analysierenden Genregion führt dazu, dass sowohl 5caCs (ursprünglich 5mC) als auch Cytosine (C) als Thymin (T) erscheinen, während *β*-Glucosyl-5-Hydroxymethylcytosine (5gmC) als Cytosine detektiert werden (Abbildung 3-4). Da es sich bei den 5gmCs um ursprüngliche 5hmCs handelt, ist nunmehr eine Unterscheidung zu 5mCs möglich. Mittels Pyrosequenzierung wurden die Mengen an 5hmC und 5mC erfasst. Das TAB-Seq wurde gemäß der Anleitung des verwendeten 5hmC TAB-Seq Kit von Wisegene durchgeführt. Vor dem eigentlichen Prozedere musste die genomische DNA sonifiziert und erneut gefällt werden. Dazu wurden 20 µg genomische DNA in 1 ml TE-Puffer mit 25 Zyklen sonifiziert (je 30s an, 30s aus) und die Sonifikation durch Agarosegelelektrophorese in einem 2%-igen Gel überprüft (300 bp Fragmente erwünscht). Im Anschluss erfolgte das Ausfällen der DNA durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaAc, 1 Vol 100% Isopropanol, Mischen und Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 20 µl ddH₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

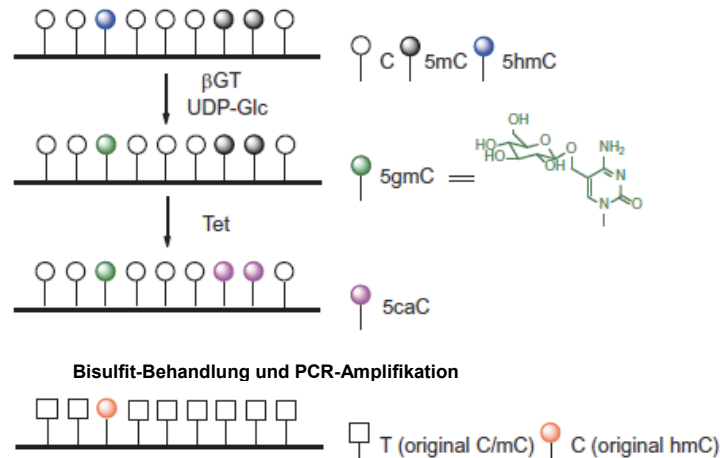


Abbildung 3-4: Prinzip des Tet-assisted bisulfite sequencing (TAB-Seq). In der genomischen DNA enthaltene 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) werden durch Glykosylierung geschützt. Mit Hilfe Tet-vermittelter Oxidation werden 5-Methylcytosine (5mC) zu 5-Carboxylcytosinen (5caC) konvertiert. Nach Bisulfitbehandlung und PCR-Amplifikation der zu analysierenden Genregion erscheinen sowohl 5caCs (ursprünglich 5mC) als auch Cytosine (C) als Thyminen (T), während β -Glucosyl-5-Hydroxymethylcytosine (5gmC) als Cytosine detektiert werden. Da es sich bei den 5gmCs um ursprüngliche 5hmCs handelt, ist nunmehr eine Unterscheidung zu 5mCs möglich. (modifiziert nach Yu *et al.*, 2012).

3.2.7.8 Methylated DNA-Immunoprecipitation (MeDIP)

Die Daten des TAB-Seq wurden mit Hilfe einer *Methylated DNA-Immunoprecipitation* (MeDIP), die neben 5-Methylcytosin (5mC) ebenfalls 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) erfassen kann, verifiziert, wobei auch diese Technik zunächst etabliert werden musste. Bei der MeDIP handelt es sich um eine Immunpräzipitation mit 5mC bzw. 5hmC spezifischen Antikörpern. Die Durchführung erfolgte wie nachfolgend beschrieben:

Sonifikation der genomischen DNA:

- 20 μ g genomische DNA in 450 μ l 10x IP-Puffer sonifizieren (20 Zyklen je 30s an, 30s aus)
- 8 μ l Sonifikat mit Ladepuffer versetzen und auf ein 1%-iges TAE-Gel auftragen (Fragmente sollten zwischen 200-800 bp groß sein)
- je 100 μ l sonifizierte DNA in 4 Eppendorfgefäße aufteilen

Immunpräzipitation:

- Proben in kochendem Wasser für 10 min hitzedenaturieren und sofort für 10 min auf Eis abkühlen lassen
- 1 Probe der hitzedenaturierten DNA als Input bei -20°C wegfrieren
- Zugabe von 10 μ g Antikörper (IgG, 5mC, 5hmC)
- Inkubation über Nacht auf Drehrad bei 4°C
- Zugabe von 50 μ l Dynabeads Protein G
- 2 h auf Drehrad bei 4°C inkubieren
- mit Hilfe des Invitrogen *magnetic rack* die *beads* mit 1 ml IP-Puffer (1x) 4 mal waschen

- *beads* in 250 µl *Digestionbuffer* resuspendieren und 5 µl Proteinase K (20mg/ml Stock) zugeben
- Inkubation über Nacht auf Schüttler bei 1000 rpm und 50 °C

Aufreinigung der DNA:

- Zugabe von 400 µl Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Mix (25/24/1), 30 sec vortexen
- 3 min bei 13000 rpm zentrifugieren, obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Zugabe von 5 µl Glycogen (2 µg/µl Stock), mischen
- Zugabe von 16 µl 5 M NaCl und 800 µl 100% Ethanol
- bei -80°C für 30 min präzipitieren
- bei 13000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugieren
- Pellet mit 500 µl 70%-igem EtOH waschen (Zentrifugation bei 4°C)
- Pellet in 60 µl TE-Puffer resuspendieren

MeDIP-PCRs:

Mit der immunpräzipitierten DNA sowie der Input-DNA wurden sowohl semiquantitative (qualitative) als auch quantitative genspezifische PCRs für unterschiedliche Gen-Regionen durchgeführt. Die PCR-Bedingungen sind nachfolgend aufgeführt. Die Auswertung der semiquantitativen PCRs erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Tabelle 3-18: Parameter für die MeDIP-PCRs

Gen	Annealing-Temp. (T _A) in C°	Zyklen (x)	Länge des PCR-Produktes in bp
<i>DUSP2</i> Pr. U2/L2	67,5	40	236
<i>RASSF5C</i> Pr. U3/L3	64	37	136
<i>β-Aktin</i>	60	38	226

PCR-Programm (semiquantitativ)

- | | | |
|--------------------------|-------|------------|
| 1. T = 95°C | 2 min | } x Zyklen |
| 2. T = 95°C | 30 s | |
| 3. T = T _A °C | 40 s | |
| 4. T = 72°C | 40 s | |
| 5. T = 72°C | 4 min | |
| 6. T = 4°C | 10 s | |
| 7. end | | |

PCR-Programm (quantitativ)

- | | |
|----------------------|-------------|
| 95°C 15 sec | } 50 Zyklen |
| 60°C 30 sec | |
| 72°C 30 sec | |
| Schmelzkurve 72-95°C | |

PCR-Ansatz (semiquantitativ):

2,5 µl NH₄-Puffer
 2 µl dNTPs (2,5 mM)
 0,75 µl MgCl₂ (50 mM)
 1 µl *Forward*-Primer (10 pmol/µl)
 1 µl *Reverse*-Primer (10 pmol/µl)
 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
 x µl H₂O
2 µl DNA
 25 µl Gesamtvolumen

PCR-Ansatz (quantitativ):

5 µl Cyber Select
 1 µl Primer-Mix (*Forw./Rev.* 1:1; 10 pmol/µl)
 2 µl H₂O
2 µl DNA
 10 µl Gesamtvolumen

3.2.7.9 Illumina 450K Array

Zur genomweiten Analyse von 5-Methylcytosinen und 5-Hydroxymethylcytosinen wurde ein Infinium *HumanMethylation450K BeadChip Array* von Illumina (<https://www.illumina.com>) bei *Life and Brain*, Bonn in Auftrag gegeben. Die *Bead-Array*-Technologie ist eine DNA-Chip Technologie aus der Halbleiterfertigung, mit deren Hilfe bekannte Gene auf einem Plastik- oder Glasplättchen, einem sog. *Microarray*, analysiert werden können. Die einzelnen Regionen des *Microarrays* sind mit einzelsträngigen Oligonukleotiden beschichtet, die mit der zu analysierenden DNA hybridisieren. Der 450K *Methylation Array* umfasst mehr als 480000 CpG Dinukleotide. Neben Promotorregionen analysiert dieser Assay zusätzlich CpG-ärmere Regionen wie „CpG-*Island Shores*“ und „*Shelves*“, 3' und 5' untranslatierte Regionen (UTR), Genkörper-Regionen, DNase hypersensitive Regionen, miRNA Promotoren und andere ncRNAs sowie SNP-Positionen (Touleimat & Tost, 2012). Jedes CpG Dinukleotid wird mit einer durchschnittlichen zufälligen Verteilung von 15-30 Oligonukleotiden pro Array pro CpG Position repräsentiert (http://www.illumina.com/applications/epigenetics/array-based_methylation). Für den Array wurde TAB-modifizierte DNA aus tetrazyklin-induzierten TREx293-chCTCF Zellen verwendet. Als Kontrollansätze wurden uninduzierte Zellen sowie nicht mit TET-Protein oxidierte DNA mitgeführt. Die Durchführung des Assays inklusive vorheriger Bisulfit-Behandlung wurde von *Life and Brain* in Bonn übernommen. Die generierten Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Bartkuhn (Institut f. Genetik, Gießen) und M. Schneider (Masterstudent am Institut f. Genetik, Gießen) mittels der Programme R und *GenomeStudio* ausgewertet.

3.2.8 RNA-Expressionsanalyse**3.2.8.1 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)**

„Reverse Transkriptase PCR“ bezeichnet die Amplifikation von cDNA-Sequenzen, die zuvor durch reverse *in vitro*-Transkription der mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase synthetisiert wurden. Diese Technik ermöglicht den Nachweis von Veränderungen der mRNA-Expression verschiedener Gene. Durch den Einsatz von genspezifischen Primern

kann die Expressionsrate im Verhältnis zu einem *housekeeping*-Gen (z.B. β -Aktin oder *GAPDH*) ermittelt werden.

Im Rahmen der Expressionsanalysen wurden sowohl qualitative (semi-quantitative) als auch quantitative PCRs (*Realtime*) durchgeführt.

Vor der Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte ein DNAase-Verdau (siehe Punkt 3.2.3.2). Für die anschließende Umschreibung wurden 10 μ l, d.h. 1 μ g DNase behandelte RNA verwendet. Die vollständige Umschreibung wurde mittels -RT-PCR, d.h. einer PCR für β -Aktin mit der DNase-behandelten, nicht in cDNA umgeschriebenen RNA überprüft.

Nachfolgend sind der PCR-Ansatz und das PCR-Programm für die Reverse Transkription sowie die PCR-Ansätze und das Programm für die semiquantitativen und quantitativen RT-PCRs dargestellt. Die Produkte der semiquantitativen PCRs wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen.

Programm Reverse Transkription:

1. T = 62°C 10 min
2. *hold* 62°C Inkubation der Proben auf Eis;
Thermocycler kühlt auf 42°C;
Zugabe der reversen
Transkriptase und RNasin
3. *hold* 42°C Platzieren der Proben im
Thermocycler
4. T = 42°C 1 h
5. T = 90°C 5 min
6. *end*

Ansatz Reverse Transkription:

- 5 μ l MMLV-Puffer (5x)
- 8 μ l dNTPs (2,5 mM)
- 1 μ l Oligo dTPRimer (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l Hexamer Primer (10 pmol/ μ l)
- 10 μ l DNase behandelte RNA (1 μ g)
- 0,5 μ l Reverse Transkriptase (100 U)
- 0,5 μ l Ribolock (20 U)
- 26 μ l Gesamtvolumen

RT-PCR-Programm (semiquantitativ)

1. T = 95°C 2 min
 2. T = 95°C 30 s
 3. T = T_A °C 30 s
 4. T = 72°C 30 s
 5. T = 72°C 10 min
 6. T = 0°C 5 s
 7. *end*
- } x Zyklen

- 2,5 μ l NH_4 -Puffer (10x)
- 2 μ l dNTPs (2,5 mM)
- 0,75 μ l $MgCl_2$ (50 mM)
- 1 μ l *Forward*-Primer (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l *Reverse*-Primer (10 pmol/ μ l)
- 0,5 μ l *Taq* DNA-Polymerase (5 U/ μ l)
- 14,25 μ l H_2O
- 3 μ l cDNA 1:4 verdünnt
- 25 μ l Gesamtvolumen

RT-PCR-Programm (quantitativ)

- 95°C 15 sec
 - 60°C 30 sec
 - 72°C 30 sec
- } 50 Zyklen

- 5 μ l Cyber Select
- 1 μ l H_2O
- 3 μ l cDNA 1:4 verdünnt
- 10 μ l Gesamtvolumen

Schmelzkurve 72-95°C

Die jeweiligen *Annealing*-Temperaturen (T_A) und Zyklusanzahlen für die semiquantitativen RT-PCRs sind Tabelle 3-19 zu entnehmen.

Tabelle 3-19: Parameter für semiquantitative RT-PCRs

Gen	T_A (°C)	Zyklen (x)
<i>AATK</i>	60	35
<i>β-Aktin</i>	60	25
<i>BORIS</i>	63	35
<i>chCTCF</i>	55	30
<i>hCTCF</i>	63	30
<i>DUSP2</i>	61	35
<i>DUSP8</i>	60	35
<i>DUSP10</i>	60	35
<i>PARG</i>	58	30
<i>RASSF1A</i>	60	36
<i>RASSF2A</i>	60	30
<i>RASSF5A</i>	60	30
<i>RASSF5C</i>	60	30
<i>RASSF10</i>	64	38
<i>TET1</i>	63	33
<i>TET2</i>	63	33
<i>TET2CD</i>	60	25
<i>TET3</i>	63	33
<i>SUMO1</i>	60	30
<i>SUMO2</i>	60	30
<i>SUMO3</i>	60	30
<i>SUMO4</i>	60	30

3.2.8.2 *Affymetrix human ST1.0 S Array*

Für die genomweite Expressionsuntersuchung der Tetrazyklin abhängig *chCTCF* exprimierenden TREx293 Zellen wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Böttger (Max-Planck-Institut (MPI) in Bad Nauheim) ein *Affymetrix human ST 1.0 S Array*

durchgeführt. In einem weiteren Ansatz wurde die genomweite Auswirkung einer transienten Überexpression von hBORIS in HEK293-Zellen analysiert. Das *GeneChip Gene 1.0 ST* Format von Affymetrix bildet mehr als 28.000 Gene ab, die jeweils über durchschnittlich 26 Oligonukleotid-Sonden (25-mere) repräsentiert sind. Beim *ST*-Format bestehen die *Probe Sets* nur aus *Perfect Match* Sonden. Eine generelle Determinierung unspezifischer Hintergrundsignale erfolgt hier nicht über *Mismatch*-Oligonukleotide, sondern über einen Satz von etwa 20.000 sogenannter „*Background*“-Sonden, die auf den Chip aufgebracht sind. Die Sonden selbst decken den gesamten Genbereich ab, so dass ein realistisches Bild der Expression widergegeben werden kann (Dissertation Kessel, 2010). Die für den Array verwendete RNA wurde zum Einen aus Tetrazyklin induzierten und somit chCTCF exprimierenden TRex293 Zellen und zum Anderen aus transient mit hBORIS transfizierten HEK293-Zellen isoliert und DNase behandelt. Der Array wurde von einer technischen Assistentin am MPI in Bad Nauheim durchgeführt und von Dr. T. Böttger bioinformatisch aufgearbeitet.

3.2.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Diese Methode wurde entwickelt, um die direkte Interaktion von Proteinen mit einem spezifischen Bereich genomischer DNA nachweisen zu können. Die Grundlage bildet dabei die stabile, aber reversible Vernetzung von Protein und DNA (*crosslinking*), gefolgt von einer spezifischen Protein-Isolierung mittels Immunreaktion und Aufhebung der Vernetzung. Der Nachweis der Interaktion erfolgt über eine spezifische Amplifizierungsreaktion (PCR) (Paprotka, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Chromatin-Immunopräzipitation eingesetzt, um die Bindung von CTCF an Promotoren zu analysieren. Die Durchführung gestaltete sich gemäß folgendem Protokoll.

Es sollten mindestens 1×10^7 Zellen für ChIP verwendet werden.

- 37% Formaldehyd auf eine Endkonzentration von 1% direkt in das Zellmedium geben, 10 min schwenken bei RT
- Zugabe von 1/7 Vol. 1 M Glycin zum Medium, 5 min schwenken bei RT
- Zellen 2x mit 10 ml kaltem 1x PBS waschen
- Zellen in 1 ml kaltem 1x PBS ernten
- 5 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in 1 ml SDS-Lysepuffer resuspendieren und für 10 min auf Eis inkubieren
- Sonifizierung der Zellen auf Eis (Fragmente sollten ca. 500 bp groß sein):
20% Amplitude; 60 Zyklen 1 sec, dazwischen 2 sec Pause
- 10 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugieren
- Überstand direkt weiterverwenden oder mit 5% Glycerin versetzen und bei -80°C lagern
- Äquilibrierung der Protein-A-Agarose *beads*:
pro IP 30 µl *beads* mit 500 µl *Dilutionbuffer* mischen, 1 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen

- zu den *beads* 1:10 verdünnten Zellextrakt geben (150 µl Zellextrakt + 1350 µl *Dilutionbuffer*), invertieren und 5 µl IgG-AK zufügen, 2 h bei 4°C auf Drehrad inkubieren
- 2 x 15 µl Zellextrakt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C lagern (10% Input)
- nach der zweistündigen Inkubation bei 2000 rpm und 4°C für 1 min zentrifugieren
- Überstand in neue Eppendorfgefäße überführen und den entsprechenden Antikörper zufügen (ca. 5 µg; H3: 2 µl; IgG: 5 µl; CTCF: 5 µl)
- Inkubation bei 4°C über Nacht auf Drehrad
- Suspension auf 30 µl zuvor äquilibrierte Protein-A-Agarose *beads* geben, 2 h bei 4°C auf Drehrad inkubieren
- 1 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- *beads* einmal mit je 900 µl Niedrigsalz-, Hochsalz- und LiCl-Puffer und zweimal mit TE-Puffer waschen (5 min Inkubation der *beads* mit dem entsprechenden Waschpuffer, 1 min bei 2000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, alles bei 4°C)
- *beads* in 100 µl TE-Puffer resuspendieren, 1 µl 10 mg/ml RNaseA zufügen und 1 h bei 37°C inkubieren
- Input ab hier wieder mitverwenden
- 7,5 µl 10% SDS (final 0,5%) und 3,8 µl 20 mg/ml Proteinase K (final 0,5 mg/ml) zugeben, Inkubation für 4 h bei 37°C
- Inkubation über Nacht bei 65°C
- *beads* bei 2000 rpm für 1 min abzentrifugieren und Überstand in neue Eppendorfgefäße überführen
- präzipitierte DNA über *QIAquick Purification Kit* reinigen, in 40 µl ddH₂O eluieren
- genspezifische PCRs mit 2 µl DNA durchführen

Die Bedingungen für die ChIP-PCRs (semiquantitativ und quantitativ) sind in Tabelle 3-20 aufgeführt. Die PCR-Programme und Basis-Ansätze entsprechen denen der MeDIP-PCRs und sind unter Punkt 3.2.7.8 zu finden.

Tabelle 3-20: Variable Parameter für die ChIP-PCRs

Gen	Annealing- Temp. (T _A) in C°	Zyklen (x)	Länge des PCR- Produktes in bp
<i>DUSP2</i> putative CTCF-Bindestelle	67,5	33	236
<i>DUSP2</i> Negativkontrolle (keine CTCF-Bindestelle)	64	33	120
<i>DUSP2</i> Positivkontrolle (CTCF-Bindestelle)	64	33	233
<i>RASSF5C</i> putative CTCF-Bindestelle	64	37	136
<i>RASSF5C</i> Negativkontrolle (keine CTCF-Bindestelle)	63	35	141
<i>RASSF5C</i> Positivkontrolle (CTCF-Bindestelle)	64	35	123
<i>AATK</i> (U3/L3) putative CTCF-Bindestelle	66	33	232
<i>AATK</i> (U4/L4) putative CTCF-Bindestelle	67	33	235

AATK Negativkontrolle (keine CTCF-Bindestelle)	63	33	168
AATK Positivkontrolle (CTCF-Bindestelle)	66	33	285

3.2.10 Nachweis von Proteinen

Für den Nachweis von CTCF-*Knockdown* und CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen auf Proteinebene wurden eine SDS-PAGE mit sich anschließendem WesternBlot und Immunodetektion durchgeführt. Ebenfalls wurde die Proteinstabilität der verwendeten CTCF-Konstrukte, d.h. der Vektoren mit einzelnen CTCF-Domänen, dem Deletionskonstrukt mit fehlender CTCF-PARYlierungsstelle sowie den Konstrukten mit mutierten CTCF-SUMOylierungsstellen, mittels WesternBlot nachgewiesen.

3.2.10.1 Lyse der Zellen

Alle Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Zunächst wurden die Zellen 2-mal mit kaltem PBS gewaschen, dann in 1 ml PBS abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurde 3 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Zum Überstand wurde 1 ml Lysepuffer gegeben und der Ansatz für 30 min bei 4°C inkubiert. Es schloss sich eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 10000 rpm an. Dann wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C, sofern nicht direkt mit dem Lysat weitergearbeitet wurde.

3.2.10.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Um dies zu gewährleisten, wurden die Proben in Laemmli-Puffer (100 µl Lysat + 50 µl Laemmli-Puffer) für 10 min bei 95°C aufgeköcht, was zur Denaturierung der Proteine führt. Das im Puffer enthaltene SDS spaltet Wasserstoffbrücken und überdeckt die Eigenladung der Proteine, was dazu führt, dass alle Proteine eine negative Ladung aufweisen. Der ebenfalls im Puffer vorhandene β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken. So weisen alle Proteine ein konstantes Ladungs-zu-Masse-Verhältnis auf. Die Auftrennung erfolgte über eine diskontinuierliche Elektrophorese, bei der die Proteine zuerst in ein Sammelgel mit neutralem pH wandern, in dem sie aufkonzentriert werden und anschließend in ein Trenngel mit basischem pH, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich durch unterschiedliche Porengröße und pH-Werte. Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngelpuffer führt zu einem Stapelungseffekt an der Grenze zum Trenngel. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein standardisiertes Proteingemisch (Marker) mitgeführt. Der Gellauf wurde in einer Apparatur von BIORAD in 1x Laufpuffer bei einer Spannung von 120 V ausgeführt.

Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist im Folgenden aufgeführt.

<u>7,5% Trenngel :</u>	<u>4% Sammelgel:</u>
4,92 ml H ₂ O	6,1 ml H ₂ O
2,48 ml Acrylamid/Bis (30%)	1,3 ml 30% Acrylamid/Bis
2,5 ml Trenngelpuffer	2,5 ml Sammelgelpuffer
100 µl SDS 10%	100 µl 10% SDS
50 µl APS 10%	50 µl 10% APS
5 µl TEMED	10 µl TEMED

3.2.10.3 WesternBlot

Der WesternBlot ermöglicht den Transfer von zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran. Da die Proteine mit SDS beladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode und können so aus der Gelmatrix auf eine Membran transferiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen verwendet, die vor dem Blot-Vorgang durch Inkubation mit Methanol 10 s aktiviert wurden. Angewendet wurde die so genannte *wetblot*-Methode, bei der der Proteintransfer in einem Puffer-gefüllten Tank erfolgt.

Die PVDF-Membran und 2 Filterpapiere (Whatman-Papier) wurden auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten. Das Transfer-Sandwich wurde wie folgt in Transferpuffer zusammengesetzt (die angegebene Reihenfolge bezieht sich auf die Anordnung von der Anode aus betrachtet): Eine Schwamm-Matte gefolgt von einem Filterpapier, der aktivierten Membran, dem Gel mit den aufgetrennten und SDS-beladenen Proteinen, einem Filterpapier und eine Schwamm-Matte. Das in einer Plastikvorrichtung entsprechend zusammengesetzte Sandwich wurde in die *wetblot*-Apparatur (BIO-RAD) eingespannt und in einen Tank eingebracht, der mit kaltem Transfer-Puffer (1x) gefüllt war. Da es während des Gellaufs zu einem Temperaturanstieg kommen kann, wurden ein Kühlakku und ein Rührfisch mit in die Apparatur eingesetzt. Der *wetblot* wurde auf einem Magnetrührer bei 350 mA für 1,5-2 h durchgeführt.

3.2.10.4 Immunodetektion

Die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Die Immunodetektion ist eine sensitive Nachweismethode für Proteine. Sie beruht auf der immunologischen Reaktion zwischen einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) mit seinem Antigen (Protein). Zur Visualisierung dieses Antikörper / Antigen-Komplexes dient ein gegen den Primärantikörper gerichteter, enzymgekoppelter Sekundärantikörper. Aufgrund der Tatsache, dass an einen Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper binden, wird eine Signalverstärkung erreicht, die zusammen mit der hohen

Sensitivität der Enzymreaktion die Empfindlichkeit dieses Nachweissystems ausmacht. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die Primärantikörper in Kombination mit geeigneten Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern eingesetzt (Tab. 3-21).

Im Anschluss an den WesternBlot wurde die „proteinbeladene“ PVDF-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen ÜN bei 4°C mit einer Magermilchlösung (5% Milchpulver in PBST) inkubiert. Die abgesättigte Membran wurde dann für 1 h oder über Nacht mit dem in Milch / PBST verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten (je 5-10 min mit PBST) zum Entfernen unspezifisch gebundener Primärantikörper wurde die Membran für eine weitere Stunde mit einem, entsprechend in Milch / PBST verdünnten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut 3x mit PBST gewaschen und konnte für die Nachweisreaktion mit dem Chemilumineszenz-Substrat genutzt werden. Die Signalentstehung bei diesem Entwicklungssystem beruht auf einer verstärkten Peroxidase-katalysierten Chemilumineszenz. Dabei wird das Substrat Luminol von dem Enzym HRP, einer Peroxidase, oxidiert. Oxidiertes Luminol emittiert Licht, das mittels eines Abbildungssystems (Versadoc) dokumentiert werden kann.

Tabelle 3-21: Für den WesternBlot verwendete Antikörper mit Angabe der eingesetzten Menge

Antikörper	Eingesetzte Menge
α -CTCF (N2.2) (Hase)	1:2000 in 5%-iger Milch (verdünnt mit PBST)
α -GAPDH (Hase)	1:2000 in 5%-iger Milch (verdünnt mit PBST)
α -FLAG (Maus)	1:5000 in 3%-iger Milch (verdünnt in PBST)
α -Maus IgG-HRP	1:1000 in 3%-iger Milch (verdünnt in PBST)
α -Hase IgG-HRP	1:25000 in 0,5%-iger Milch (verdünnt mit PBST)

Die Erst-Antikörper sind grau unterlegt.

3.2.11 Luciferaseassay

Der Luciferaseassay erlaubt es, die Aktivität von Promotoren unter variablen Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurde der *DUSP2*-Promotor vor das Reportergen *Luciferase* kloniert (Punkt 3.2.12.8). Anschließend wurden Zellen mit diesem Vektor transfiziert und nach 24 bzw. 48 h das Genprodukt des Reportergens über die Umsetzung des Substrates gemessen. Für den Luciferaseassay wurde das *Dual Luciferase Reporter Assay System* von Promega verwendet. Der Vektor pRL-Null, in den der *DUSP2*-Promotor kloniert wurde, beinhaltet das Gen für die *Renilla-Luciferase*. Dieses Enzym katalysiert die Mono-Oxygenierung von Coelenterazin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff. Bei dieser Reaktion wird neben CO₂ Licht freigesetzt, das mittels eines Luminometers gemessen werden kann. Zur Normalisierung möglicher Unterschiede bzgl. der Transfektionseffizienz, der Gesundheit der Zellen und der Zellregulation zwischen den einzelnen Experimenten, wurde bei jeder Transfektion der Vektor pGL3.1 mit transfiziert. Dieser Vektor enthält das Gen für die *Firefly Luciferase*. Das Genprodukt katalysiert die ATP-abhängige Mono-Oxygenierung von Käfer-Luciferin in der Anwesenheit von Mg₂⁺ zu Oxyluciferin. Auch bei dieser Reaktion wird Licht

freigesetzt, das messbar ist. Zur Normalisierung wurde der Quotient aus dem Wert der *Renilla* und dem Wert der *Firefly* gebildet.

Für diesen Versuch wurden HEK-Zellen mit der Kombination aus folgenden Konstrukten transfiziert. pGL3.1 (350 ng) wurde bei allen Ansätzen co-transfiziert.

pRLNull + pEGFP	} je 1 µg pRLNull und 3 µg pEGFP
pRLNull- <i>DUSP2</i> -Promotor + pEGFP	
pRLNull- <i>DUSP2</i> -Promotor <i>i.v.m.</i> + pEGFP	
pRLNull- <i>DUSP2</i> -Promotor Δ beide CTCF-Bindestellen + pEGFP	
pRLNull + pEGFP-chCTCF	
pRLNull- <i>DUSP2</i> -Promotor + pEGFP-chCTCF	
pRLNull- <i>DUSP2</i> -Promotor <i>i.v.m.</i> + pEGFP-chCTCF	
pRLNull- <i>DUSP2</i> -Promotor Δ beide CTCF-Bindestellen + pEGFP-chCTCF	

Nach 24 oder 48 h wurde das Medium abgenommen und je 200 µl 1x Lysepuffer zugegeben. Der Ansatz wurde schüttelnd für 15 min bei RT inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension in Eppendorfgefäße überführt und 30 s bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung verwendet. Dazu wurden je 10 µl Überstand in die *wells* einer weißen 96-er Platte überführt. Als erstes wurde die *Firefly* Luciferase gemessen. Dafür wurde zu jedem *well* 33 µl LARII pipettiert, gemischt und im Luminometer das entstehende Licht gemessen. Durch Zugabe von 33 µl STOP & GLOW und 0,66 µl Substrat (Mastermix aus beiden Substanzen) wurde die erste Reaktion abgestoppt und die Messung für die *Renilla Luciferase* gestartet, wobei ebenfalls das entstehende Licht im Luminometer gemessen wurde. Um die Werte zu normalisieren, wurde der *Renilla Luciferase*-Wert durch den *Firefly Luciferase*-Wert dividiert.

3.2.12 Arbeiten mit *E. coli* / Klonierung

Eine Klonierung ist eine Technik, die es erlaubt DNA-Fragmente in einen definierten Vektor zu bringen. Innerhalb dieser Vektoren kann das eingefügte DNA-Fragment näher analysiert werden. Die Klonierung setzt sich aus der Ligation des „leeren“ Vektors und des zu untersuchenden DNA-Fragments, dem Insert zusammen. Das Ligationsprodukt wird in chemokompetente *E. coli* transformiert, in diesen vermehrt und selektiert. Im Anschluss wird das Konstrukt wieder isoliert und mit Hilfe eines Kontrollrestriktionsverdaus sowie Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft.

3.2.12.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

E. coli wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Platten bei 37°C kultiviert. Die Selektion erfolgte über das im Nährmedium enthaltene Antibiotikum in Abhängigkeit der Resistenz des eingebrachten Vektors (siehe Tabelle 3-8).

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden 750 µl LB-Bakteriensuspension mit 250 µl 80%-igem, sterilem Glycerol versetzt und in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

3.2.12.2 Plasmid-Isolation aus *E. coli*

Die in *E. coli* vermehrten Plasmide wurden aus Übernachtskulturen mit Hilfe der Kits NucleoSpin® Plasmid QuickPure und NucleoBond® Xtra Midi von Macherey-Nagel isoliert.

3.2.12.3 Kontrollrestriktion und präparativer Verdau von Plasmiden

Mit Hilfe der Restriktion wurde zum Einen die Anwesenheit und Orientierung des Inserts im Vektor überprüft (Kontrollrestriktion), zum Anderen wurden für Klonierungen das Insert aus den Vektoren herausgeschnitten sowie der Zielvektor geöffnet (präparativer Verdau).

Bei der Restriktion werden DNA-Fragmente durch Restriktionsendonukleasen an spezifischen Sequenzen gespalten. Dabei kommen Restriktionsendonukleasen vom Typ II zum Einsatz, die innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer Erkennungssequenz schneiden und kein ATP benötigen. Die Erkennungssequenzen bestehen dabei häufig aus palindromischen Sequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge werden entweder versetzt (*sticky ends*) oder mit einem geraden Schnitt (*blunt ends*) gespalten. Für die Klonierung ist es notwendig, dass der Vektor und das Insert mit den gleichen oder kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Die Restriktionen wurden nach Enzym-Herstellerangaben (Fermentas) durchgeführt. Für Kontrollrestriktionen wurden 100-200 ng Plasmid DNA eingesetzt, für präparative Verdaue im Rahmen von Klonierungen 15 µg Plasmid-DNA. Die Überprüfung der Restriktion bzw. das Auftrennen von Insert und Vektor erfolgte durch Agarosegelelektrophorese auf einem 1%-igen Gel.

3.2.12.4 Dephosphorylierung

Bei Vektoren, die nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, empfiehlt es sich zu dephosphorylieren, um zu verhindern, dass der Vektor mit seinen kompatiblen Enden religiert. Für die Dephosphorylierung wird der Vektor mit dem Enzym FastAP behandelt, welches die Hydrolyse freier Phosphatgruppen katalysiert. Die alkalische Phosphatase entfernt die 5'-Phosphate an den Schnittstellen und die Phosphodiesterbindung kann nicht wieder ausgebildet werden.

Für die Dephosphorylierung wurde 1 µl der FastAP (1 U/µl) zu dem Ansatz des präparativen Verdaus mit einem Gesamtvolumen von 50 µl pipettiert. Dieser wurde dann 40 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min bei 75°C hitzeinaktiviert. Danach konnte die Gelextraktion erfolgen.

3.2.12.5 Gelextraktion

Die Gelextraktion ermöglicht es DNA aus Gelstücken zu isolieren. Dafür werden zunächst die DNA-Fragmente des präparativen Verdaus gelelektrophoretisch voneinander getrennt. Das entstandene DNA-Fragment von Interesse kann dann herausgeschnitten werden. Die Gelextraktion wurde gemäß Anleitung mittels NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) durchgeführt.

3.2.12.6 Ligation

Durch die Ligation werden ein linearisierter Vektor und ein entsprechendes Insert mit kompatiblen Enden enzymatisch miteinander verknüpft. Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase wird eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxy- und dem 5'-Phosphat-Ende ausgebildet, wobei ATP als Kofaktor genutzt wird. Wenn die vorhergehende Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen erfolgte, ist die Orientierung des Inserts bei der Ligation festgelegt. Bei Verwendung nur eines Enzyms, muss die Orientierung erneut überprüft werden. Für die Ligation wurden 1 µl Ligase (5 U/µl), 1 µl Ligasepuffer (10x), 100 ng Vektor und die dreifache Menge an Insert auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT inkubiert und im Anschluss für die Transformation eingesetzt. Neben dem Ligationsansatz wurde ein Ansatz ohne Insert mitgeführt, um eine mögliche Religation des Vektors zu kontrollieren. Das Verhältnis von Insert zu Vektor kann der jeweiligen Klonierung angepasst werden.

3.2.12.7 Transformation

Unter Transformation versteht man die nicht-virale Aufnahme freier DNA in kompetente Bakterienzellen. In der Molekularbiologie wird die Transformation genutzt, um rekombinante DNA in Bakterien zu vervielfältigen. Die rekombinante DNA ist meist ein Plasmid, welches nach einer Klonierung von DNA-Abschnitten in einem Vektor entstanden ist. In dieser Arbeit wurden die kompetenten *E.coli* Stämme *TAM*, *DH5α* und XL10-Gold verwendet. Für *TAM* und *DH5α* gestaltete sich die Transformation folgendermaßen: Diese *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut und im Anschluss die Hälfte des Ligationsansatzes mit 25 µl kompetenten *E.coli* gemischt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s, zweiminütiges Abkühlen auf Eis, die Zugabe von 200 µl SOC-Medium und eine einstündige Inkubation, schüttelnd bei 37°C. Die Ansätze wurden auf entsprechende selektive Medien ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Klone wurden nach Plasmid-Isolation durch Kontroll-Restriktion und Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft.

Die Transformation im Anschluss an Mutagenesen erfolgte in dem ultrakompetenten *E.coli*-Stamm *XL10-Gold* und wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.12.8 Promotor-Klonierung

Für die nähere Charakterisierung des *DUSP2*-Promotors und um den Einfluss von CTCF auf den *DUSP2*-Promotor *in vitro* zu erfassen, wurde dieser in einen Luciferase-Vektor kloniert und im Anschluss für Luciferaseassays verwendet.

3.2.12.8.1 Promotor-PCR

Zunächst wurde der *DUSP2* Promotor mit spezifischen Primern, unter Verwendung genomischer, humaner Fibroblasten DNA als Template, amplifiziert. Bei dieser PCR handelt es sich um eine *Hotstart*-PCR, d.h. ein Gemisch aus H₂O und *Taq*-DNA Polymerase wird erst nach dem Denaturierungsschritt zugegeben. Dies hat den Vorteil, dass eine Polymerase-Aktivität während der PCR-Vorbereitung ausgeschlossen ist und die nicht spezifische Amplifikation reduziert wird, was zur Erhöhung der Produktmenge und zur Reduktion von Nebenprodukten führt.

Die beste Amplifikation wurde unter folgenden Bedingungen erzielt:

PCR- Ansatz:

2,5 µl NH₄-Puffer (10x)
 2 µl dNTPs (2,5 mM)
 0,75 µl MgCl₂ (50 mM)
 1 µl *Forward*-Primer (10 pmol/µl)
 1 µl *Reverse*-Primer (10 pmol/µl)
 2 µl genomische DNA aus HF-53 (ca. 100 ng/µl)
 15,25 µl H₂O
 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)

PCR-Programm:

Lid 110°C Proben in den Cyclor
 1. T = 99°C 5 min
 2. Hold 72°C *enter*; *Hotstart* mit H₂O/*Taq* DNA-Polymerase-Mix
 3. T = 95°C 1 min
 4. T = 95°C 45 s
 5. T_A = 65°C 45 s
 6. T = 72°C 1:30 min
 7. T = 72°C 4 min
 8. *end*

} 50 Zyklen

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Gelextraktion (siehe Punkt 3.2.12.5.). Eluiert wurde in 10 µl ddH₂O.

3.2.12.8.2 Ligation in pGEM-T

Die Ligation des Promotors in den linearen Vektor pGEM-T sowie die Blau-Weiß-Selektion wurde nach dem Protokoll von Promega „pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems“ durchgeführt. Dies ermöglicht den Ausschluss von Kolonien, die das Insert nicht tragen.

3.2.12.8.3 Klonierung in pRLNull

Nach Überprüfung der Zwischenklonierung in pGEM-T (Punkt 3.2.12.8.2) wurde der *DUSP2*-Promotor über *BamHI/BglII* in den Luciferase-Vektor pRLNull kloniert. Die nötigen Klonierungsschritte sind unter Punkt 3.2.12.2- 3.2.12.7 zu finden.

3.2.12.9 Mutagenesen

Die Mutagenesen wurden alle unter Verwendung des *Quik Change Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* von Agilent Technologies gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.12.10 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei der Firma Seqlab (*Sequence laboratories* Göttingen) in Auftrag gegeben. Die nötige Probenvorbereitung ist der Homepage von Seqlab zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software BioEdit ausgewertet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CTCF auf die Regulation ausgewählter Tumorsuppressorgene (TSG) analysiert. Die Auswahl der Gene, neben Mitgliedern der *RASSF*-Familie, wurde basierend auf einer Transkriptom-Analyse nach CTCF-*Knockdown* in HeLa-Zellen (Wendt *et al.*, 2008) getroffen. Kriterien, die der Auswahl der Kandidaten zugrunde lagen, waren eine signifikante Herunterregulation der Expression nach CTCF-*Knockdown* (Wendt *et al.*, 2008), eine vermutliche tumorsuppressorische Wirkung sowie die Vorlage von CTCF-Bindestellen. Die ausgewählten Kandidatengene wurden zunächst in Bezug auf Methylierungsstatus, RNA-Expression und einem möglichen Zusammenhang dieser zwei Faktoren sowie bezüglich einer tumorsuppressorischen Wirkung untersucht, bevor der Einfluss von CTCF analysiert wurde.

4.1 Promotor-Methylierungsstatus der Gene *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C*

Die ausgewählten Kandidatengene *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* wurden zunächst hinsichtlich ihrer Promotormethylierung analysiert. Der Methylierungsstatus der jeweiligen Gene wurde mittels COBRA und teilweise Pyrosequenzierung in diversen humanen Zelllinien, überwiegend Krebszelllinien sowie bei Vorlage interessanter Befunde zusätzlich in Primärtumoren unterschiedlicher Krebsentitäten erfasst.

4.1.1 Methylierungsstatus von *AATK* in humanen Zelllinien

Der Promotor des Gens *AATK* stellt einen CpG-Insel-Promotor dar (Abb. 4-1). Innerhalb der Promotorregion wurden zwei unterschiedliche Bereiche auf Vorlage einer Methylierung untersucht. Die erste Region befindet sich *upstream* des Transkriptionsstarts am Rande der CpG-Insel, während die zweite Region bereits hinter dem Transkriptionsstart zu finden ist. Aufgrund der hohen Dichte an CpG-Dinukleotiden im Bereich vor dem Transkriptionsstart, war es nicht möglich, für diese Region Primer zu generieren. Der *downstream* des Transkriptionsstarts gelegene analysierte Bereich beinhaltet eine *TaqI*-Schnittstelle. Der Methylierungsstatus des in dieser Schnittstelle befindlichen CpG-Dinukleotids wurde mittels COBRA analysiert; der von drei weiteren *downstream* gelegenen CpG-Dinukleotiden wurde durch Pyrosequenzierung erfasst. Des Weiteren befindet sich in der *downstream*-Region eine CTCF-Bindestelle. Die CTCF-Bindestellen wurden für alle Gene mit der öffentlich zugänglichen Datenbank CTCFBSDB 2.0 ermittelt. Die *upstream* des Transkriptionsstarts gelegene Region beinhaltet ebenfalls eine *TaqI*-Schnittstelle, die für die COBRA-Analyse genutzt wurde.

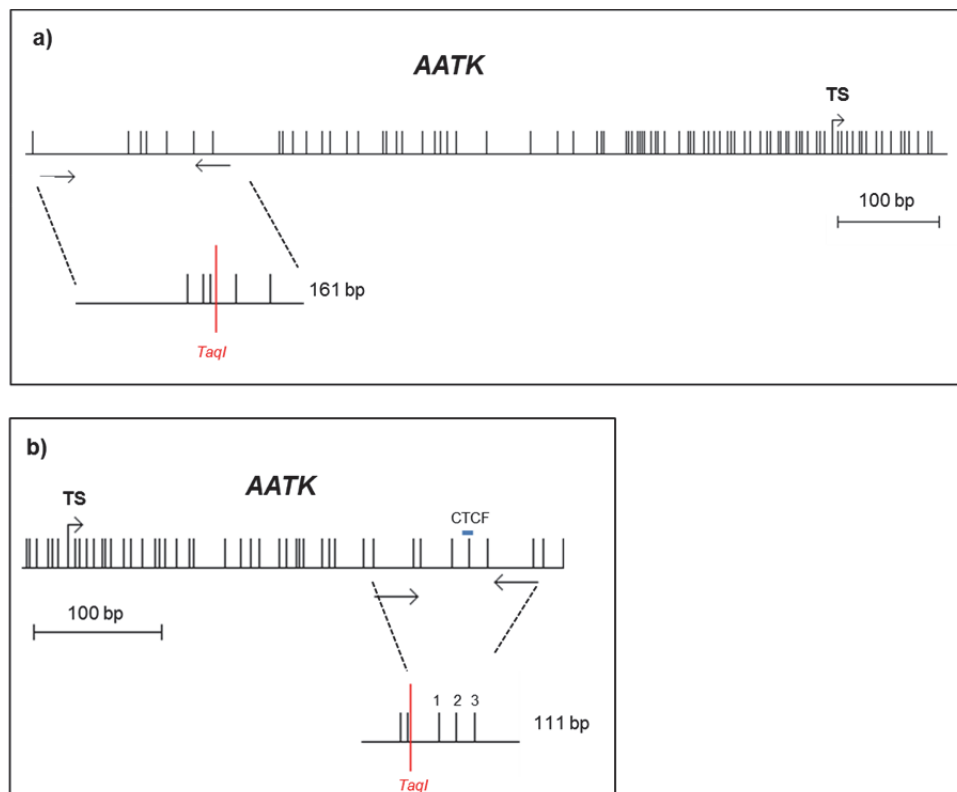


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der CpG-Insel im AATK-Promotorbereich sowie der jeweiligen TaqI-Schnittstelle innerhalb der mittels PCR amplifizierten Regionen. Die CpG-Dinukleotide sind jeweils durch einen senkrechten, schwarzen Strich gekennzeichnet. Die verwendeten Primer zur Amplifikation des zu untersuchenden Bereichs sind durch Pfeile dargestellt. Der Transkriptionsstart (TS) sowie eine CTCF-Bindestelle sind ebenfalls hervorgehoben. Die CTCF-Bindestelle wurde über die Datenbank CTCFBSDB 2.0 ermittelt. Der untere Bildabschnitt zeigt die jeweils im PCR-Produkt enthaltene TaqI-Schnittstelle und als Zahlen markiert die CpG-Dinukleotide, die mittels Pyrosequenzierung analysiert wurden. Für die Methylierungsanalyse wurden zwei Regionen innerhalb der AATK-CpG-Insel betrachtet: eine im Promotorbereich, am Rande der CpG-Insel (a) und eine hinter dem Transkriptionsstart (b).

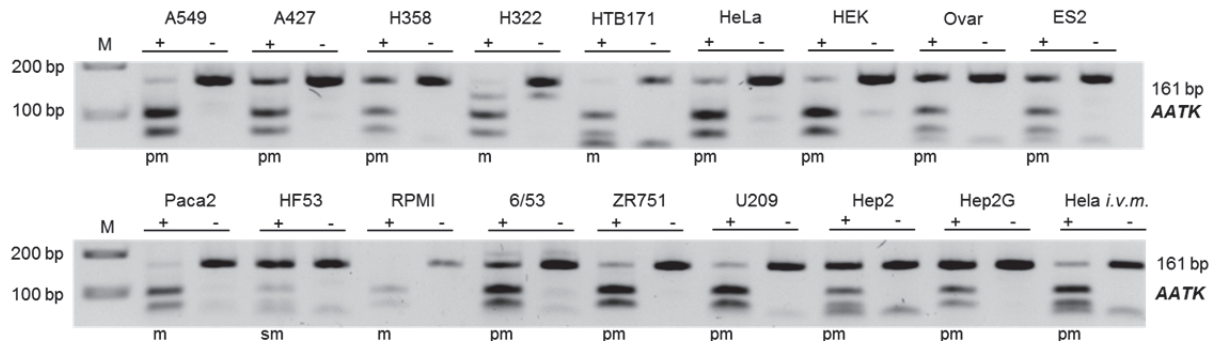
Die *upstream* des Transkriptionsstarts gelegene Region weist in allen untersuchten Krebszelllinien eine partielle oder vollständige Methylierung auf (Abb. 4-2a und Tab. 4-1), erkennbar an der Fragmentation des PCR-Produktes. Zu den Zelllinien mit vollständig methylierter Region *upstream* des Transkriptionsstarts gehören die Lungenkrebszelllinien H322 und HTB171, die Ovarialkarzinomzelllinien OAW42 und SKOV33 ebenso wie die Pankreaskarzinomzelllinie Paca2 und die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie RPMI. Lediglich die als Kontrollgewebe verwendeten humanen Fibroblasten (HF53) sind im analysierten Bereich sehr schwach methyliert (Abb. 4-2a). Die ovariäre Oberflächenepithelzelllinie HOSE weist hingegen eine vollständige Methylierung auf (Tab. 4-1).

Die *downstream* des Transkriptionsstarts gelegene Region von AATK liegt in den Lungenkrebszelllinien A549, A427, H322, HTB171, H358, der Melanomzelllinie IGRI, der Sarkomzelllinie 6/53, den Mammakarzinomzelllinien ZR751 und MCF7, der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, der Larynxkarzinomzelllinie Hep2 sowie in der Thyroidkarzinomzelllinie FTC133 und der embryonalen Nierenzelllinie HEK293 methyliert vor (Abb. 4-2a,b und Tab. 4-1). Mittels COBRA wurde keine vollständige Methylierung detektiert; die Lungenkrebszelllinien H322 und HTB171 weisen jedoch in der Pyrosequenzierung hohe Methylierungswerte zwischen 80% und 90% auf. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Pyrosequenzierung nicht das gleiche CpG-Dinukleotid wie die COBRA erfasst. Ebenso verhält es sich mit den Zelllinien SKMel13 und FTC133 bei denen das in der COBRA

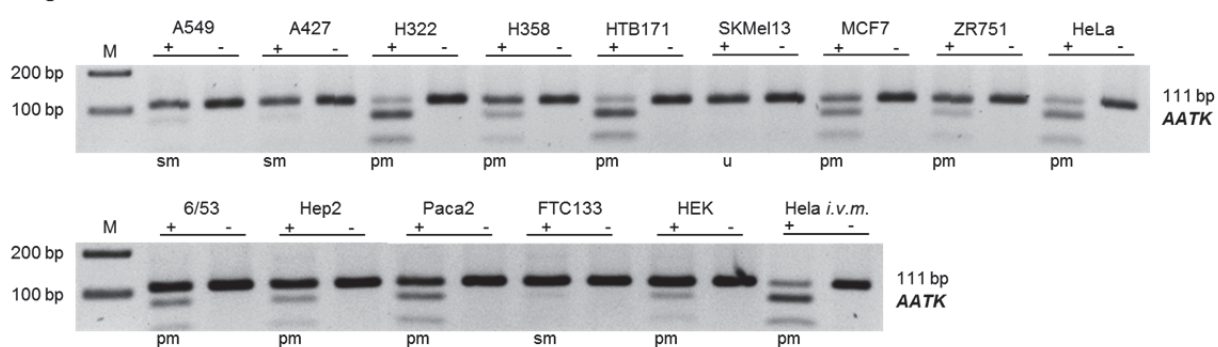
untersuchte CpG (*TaqI*-Schnittstelle) unmethyliert bzw. nahezu unmethyliert vorliegt (Abb. 4-2a), während die drei folgenden CpGs (1,2,3) partielle Methylierungen aufweisen (Abb. 4-1 und 4-2b).

a)

Region upstream des TS:



Region downstream des TS:



b)

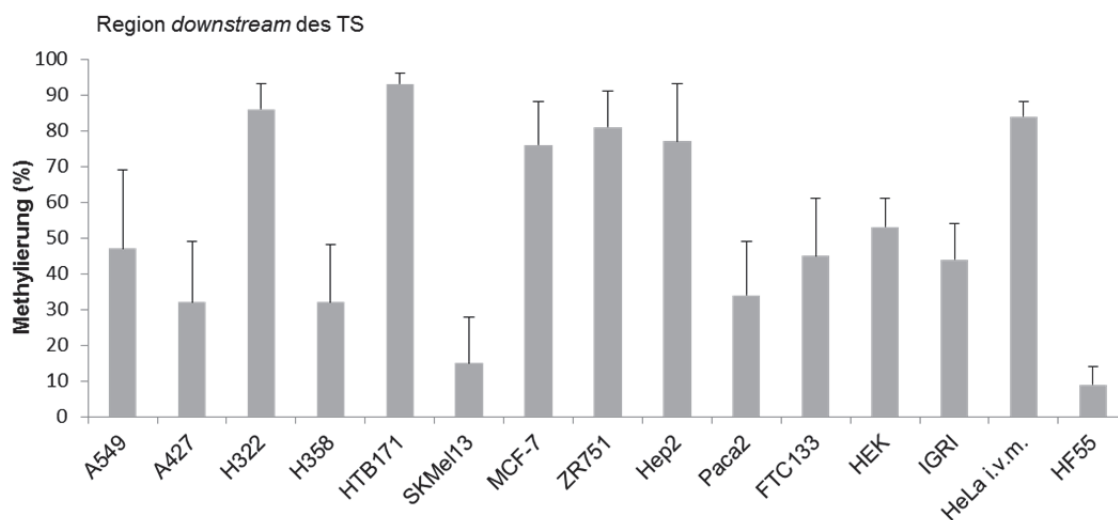


Abbildung 4-2: Methylierungsstatus der AATK-CpG-Insel im Promotorbereich diverser humaner Zelllinien. a) Ergebnisse der Bestimmung des AATK-Methylierungsstatus mittels COBRA. Innerhalb der CpG-Insel wurden zwei Regionen analysiert: eine *upstream* und eine *downstream* des Transkriptionsstarts (TS). Aus humanen Zelllinien isolierte DNA wurde nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen-spezifischen Primerpaaren amplifiziert und das jeweils entstandene PCR-Produkt im Anschluss mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut. Neben dem Restriktionsansatz (+) wurde ein *mock*-Ansatz (-) ohne Enzym mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte zusammen mit einem 100 bp-Marker (M) im 2%-igen Agarosegel. b) Quantitative Methylierungsdaten der *downstream* des TS gelegenen AATK-CpG-Insel-Region mittels Pyrosequenzierung. Die unter a) verwendete Bisulfit-DNA wurde mittels Gen-spezifischer Primer (biotinylierter *Reverse*-Primer) amplifiziert und im Anschluss Pyro-sequenziert. Die analysierte Region beinhaltet drei CpG-Dinukleotide. Der Methylierungsstatus stellt den prozentualen Durchschnittswert der Methylierungsgrade der drei CpG-Dinukleotide dar. In die Auswertung wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten einbezogen. Als Positivkontrolle wurde in beiden Experimenten *in vitro* methylierte (*i.v.m.*), Bisulfit-behandelte HeLa-DNA verwendet. Die Daten der *downstream* AATK-Region wurden von C. Herkt generiert. (u: unmethyliert, sm: schwach methyliert, pm: partiell methyliert, m: methyliert)

Bei den als Kontrollgewebe verwendeten Fibroblasten (HF55) liegt der analysierte Bereich mit einem Methylierungsstatus von 9% sehr schwach methyliert vor, womit die *downstream* Region von *AATK* als tumorspezifisch methyliert anzusehen ist.

4.1.2 Promotormethylierungsstatus von *DUSP2* in humanen Zelllinien

Der *DUSP2*-Promotor liegt ebenfalls innerhalb einer CpG-Insel (Abb. 4-3). Die in Bezug auf den Methylierungsgrad analysierte Region erstreckt sich von etwa 200 bp vor dem Transkriptionsstart bis etwa 100 bp über diesen hinaus. Um eine höhere Produktausbeute zu erlangen, wurde eine *semi-nested* PCR zur Amplifikation genutzt. Innerhalb der amplifizierten *DUSP2*-Promotor-Region finden sich drei *TaqI*-Schnittstellen, die für die COBRA-Analyse genutzt wurden. Mittels Pyrosequenzierung wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Regionen mit 5 bzw. 7 CpGs erfasst. Die erste Region (Seq1) befindet sich *upstream* des TS, während die zweite Region (Seq2) unmittelbar vor dem Transkriptionsstart liegt (Abb. 4-3). Für die Bestimmung des Methylierungsstatus in diversen humanen Zelllinien und Primärtumoren wurde nur die Region Seq1 einbezogen. Die betrachtete *DUSP2*-Promotorregion schließt zwei CTCF-Bindestellen ein.

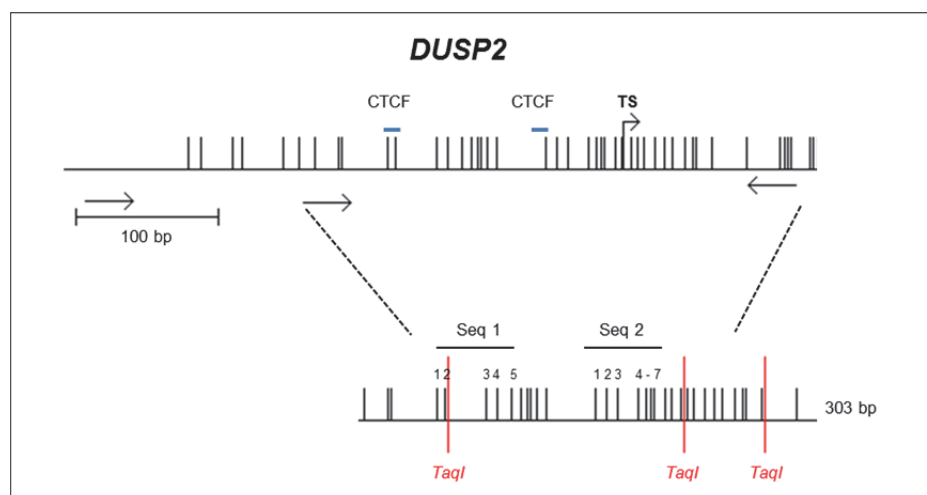
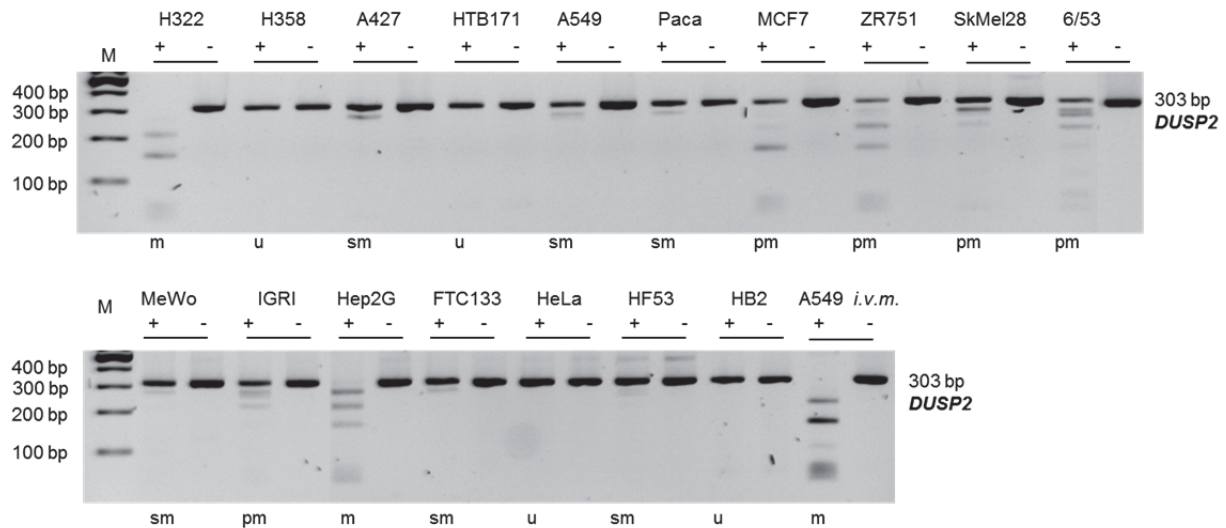


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung der Promotorregion von *DUSP2* sowie der *TaqI*-Schnittstellen innerhalb der mittels PCR amplifizierten Region. Die CpG-Dinukleotide sind jeweils durch einen senkrechten, schwarzen Strich gekennzeichnet. Die verwendeten Primer zur Amplifikation des zu untersuchenden Bereichs sind durch Pfeile dargestellt, wobei *DUSP2* mittels *semi-nested* PCR amplifiziert wurde. Der Transkriptionsstart (TS) sowie CTCF-Bindestellen sind ebenfalls hervorgehoben. Die CTCF-Bindestellen wurden über die Datenbank CTCFBSDB 2.0 ermittelt. Der untere Bildabschnitt zeigt die im PCR-Produkt enthaltenen *TaqI*-Schnittstellen und als Zahlen markiert die CpG-Dinukleotide, die mittels zweier Pyrosequenzierungen (Seq1 und Seq2) analysiert wurden. Bei der Methylierungsanalyse diverser Zelllinien und Primärtumore kam nur Seq1 zum Einsatz.

Die mittels COBRA und Pyrosequenzierung analysierte Region im *DUSP2*-CpG-Insel-Promotor liegt in den meisten untersuchten Zelllinien schwach oder partiell methyliert vor (Abb. 4-4, Tab. 4.1), darunter beispielsweise die Lungenkrebszelllinien A549, A427, die Brustkrebszelllinien MCF7 und ZR751 sowie die Melanomzelllinien SKMel28 und IGRI. Eine vollständige Methylierung findet sich der COBRA-Analyse nach nur in H322 und Hep2G,

wobei die Methylierungswerte der Pyro-sequenzierten Region geringer ausfallen. Auch hier ist anzumerken, dass in COBRA und Pyrosequenzierung nicht die gleichen CpGs analysiert wurden.

a)



b)

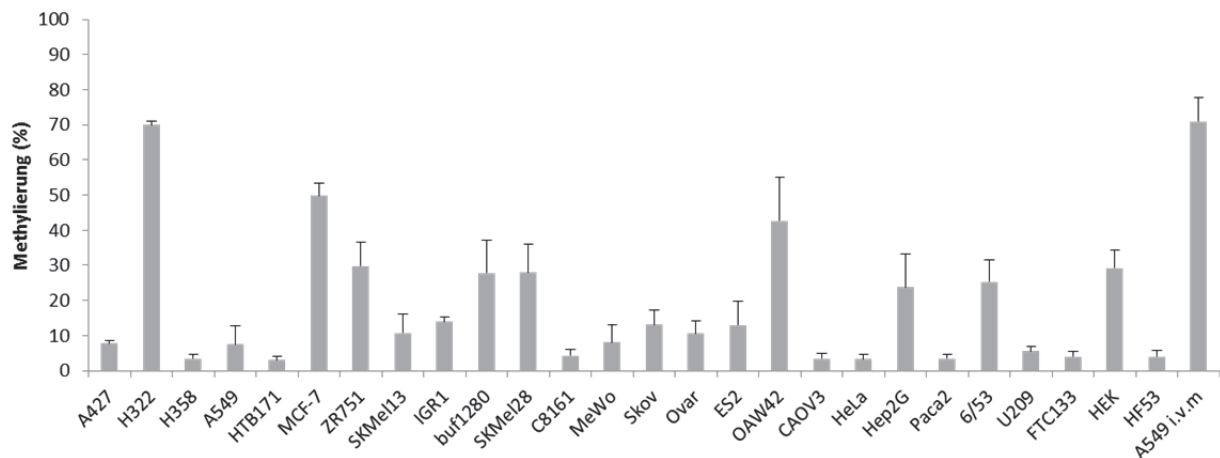


Abbildung 4-4: DUSP2-Promotormethylierungsstatus diverser humaner Zelllinien. a) Ergebnisse der Bestimmung des DUSP2-Promotormethylierungsstatus mittels COBRA. Aus humanen Zelllinien isolierte DNA wurde nach einer Bisulfit-Behandlung mit einem Gen-spezifischen Primerpaar amplifiziert und das entstandene PCR-Produkt im Anschluss mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut. Neben dem Restriktionsansatz (+) wurde ein *mock*-Ansatz (-) ohne Enzym mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte zusammen mit einem 100 bp-Marker (M) im 2%-igen Agarosegel. b) Quantitative Methylierungsdaten der DUSP2-Promotorregion mittels Pyrosequenzierung. Die unter a) verwendete Bisulfit-DNA wurde mittels Gen-spezifischer Primer (biotinylierter *Reverse*-Primer) amplifiziert und im Anschluss Pyro-sequenziert. Die analysierte Region beinhaltet fünf CpG-Dinukleotide (Seq1). Der Methylierungsstatus stellt den prozentualen Durchschnittswert der Methylierungsgrade der fünf CpG-Dinukleotide dar. In die Auswertung wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten einbezogen. Als Positivkontrolle wurde in beiden Experimenten *in vitro* methylierte (*i.v.m.*), Bisulfit-behandelte A549-DNA verwendet. (u: unmethyliert, sm: schwach methyliert, pm: partiell methyliert, m: methyliert)

Für H322 beläuft sich der Grad der Methylierung auf 70%, für Hep2G auf 24%. Nicht tumoröse Gewebe wie humane Fibroblasten und die Brustepithelzelllinie HB2 sind nur sehr schwach methyliert bzw. unmethyliert, womit von einer tumorassoziierten Methylierung ausgegangen werden kann.

4.1.3 Promotormethylierungsstatus von *RASSF5A* und *RASSF5C* in humanen Zelllinien

Die Promotoren der Gene *RASSF5A* und *RASSF5C* liegen jeweils innerhalb einer CpG-Insel (Abb. 4-5). Im Fall von *RASSF5A* wurde für die Bestimmung des Methylierungsstatus ein Bereich etwa 440 bp vor dem Transkriptionsstart analysiert, der drei *TaqI*-Schnittstellen beinhaltet. Die untersuchte *RASSF5C*-Region befindet sich hinter dem Transkriptionsstart. Die Amplifikation der *RASSF5C*-CpG-Inselregion erfolgte zur Erhöhung der Produktausbeute mittels *nested-PCR* (Abb. 4-5).

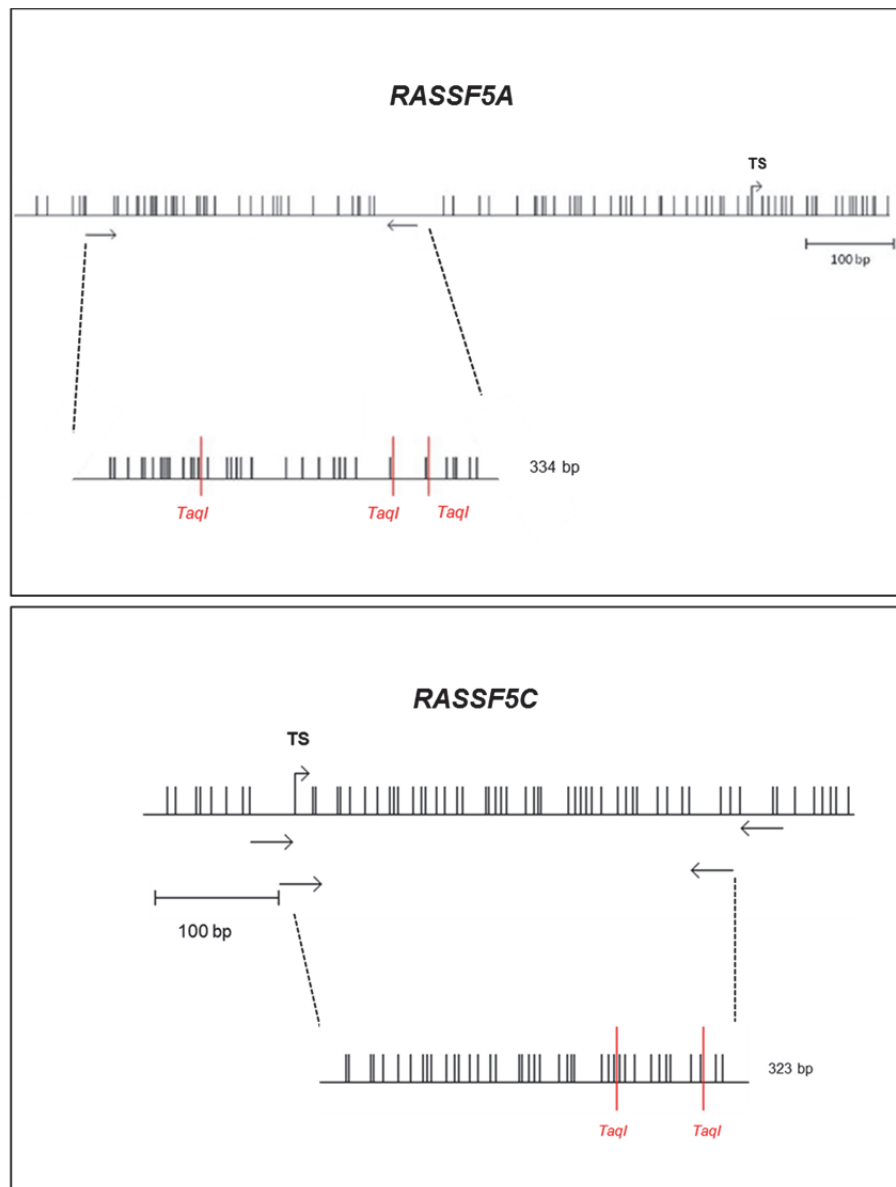


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung der CpG-Insel von *RASSF5A* und *RASSF5C* im Promotorbereich sowie der *TaqI*-Schnittstellen innerhalb der mittels PCR amplifizierten Region. Die CpG-Dinukleotide sind jeweils durch einen senkrechten, schwarzen Strich gekennzeichnet. Die verwendeten Primer zur Amplifikation des zu untersuchenden Bereichs sind durch Pfeile dargestellt, wobei *RASSF5C* mittels *nested PCR* amplifiziert wurde. Der Transkriptionsstart (TS) ist ebenfalls hervorgehoben. Der untere Bildabschnitt zeigt die im PCR-Produkt enthaltenen *TaqI*-Schnittstellen.

Die mittels COBRA untersuchten Regionen der Gene *RASSF5A* und *RASSF5C* unterscheiden sich hinsichtlich ihres Methylierungsstatus deutlich voneinander. Während *RASSF5A* in allen analysierten Krebszelllinien, abgesehen von der Larynxkarzinomzelllinie

Hep2, partiell oder vollständig methyliert ist, findet sich eine Methylierung der *RASSF5C*-Region lediglich in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und der Lungenkrebszelllinie A427; diese Methylierungen sind beide vollständig (Abb. 4-6; Tab. 4.1).

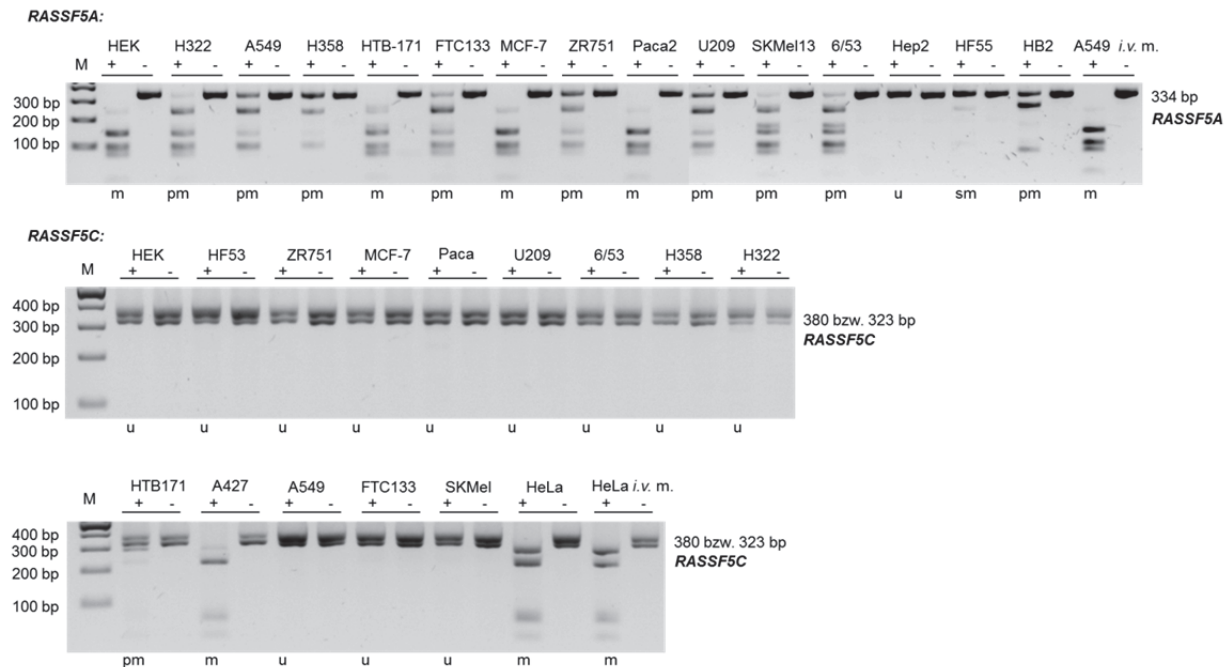


Abbildung 4-6: Methylierungsstatus der *RASSF5A*- und *RASSF5C*-CpG-Insel im Promotorbereich diverser Zelllinien. Der Methylierungsstatus wurde mittels COBRA detektiert. Dazu wurde aus humanen Zelllinien isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen-spezifischen Primerpaaren amplifiziert (bei *RASSF5C* nested PCR) und das entstandene PCR-Produkt im Anschluss mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut. Neben dem Restriktionsansatz (+) wurde ein mock-Ansatz (-) ohne Enzym mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte zusammen mit einem 100 bp-Marker (M) im 2%-igen Agarosegel. Als Positivkontrolle wurde *in vitro* methylierte (*i.v.m.*), Bisulfit-behandelte HeLa-DNA verwendet. (u: unmethyliert, sm: schwach methyliert, pm: partiell methyliert, m: methyliert)

Die als Referenzgewebe verwendeten humanen Fibroblasten weisen in der analysierten Region von *RASSF5C* keine und für *RASSF5A* eine sehr schwache Methylierung auf.

4.1.4 Zusammenfassung der Methylierungsanalyse der Gene *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A*, *RASSF5C* und *RASSF2* in humanen Zelllinien

Die vollständigen Ergebnisse der Methylierungsanalyse der Gene *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Des Weiteren sind die Daten einer Methylierungsanalyse der *RASSF2*-CpG-Insel-Promotorregion aufgeführt. Diese wurde durchgeführt, da *RASSF2* in genomweiten Screens als weiteres Kandidatengen identifiziert wurde (siehe Punkt 4.7). Die grafische Darstellung der analysierten Region ist dem Anhang zu entnehmen. Die untersuchte Region befindet sich innerhalb einer CpG-Insel etwa 700 bp hinter dem Transkriptionsstart und beinhaltet eine *TaqI*-Schnittstelle. In allen analysierten Krebszelllinien, mit Ausnahme der Sarkomzelllinie U209 und der Thyroidkarzinomzelllinie FTC133, ist die analysierte Region partiell oder vollständig methyliert. Zu den Zelllinien, bei denen der analysierte Bereich vollständig methyliert vorliegt, zählen die Mammakarzinom-

zelllinien ZR751 und MCF7, die Lungenkrebszelllinie HTB171 sowie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa. Die als Kontrollgewebe verwendeten humanen Fibroblasten und die Brustepithelzelllinie HB2 besitzen keine Methylierung in der untersuchten Region.

Insgesamt betrachtet weisen alle analysierten Regionen der untersuchten Gene, abgesehen von der *AATK upstream*-Region, eine tumorspezifische Hypermethylierung auf, d.h. in Tumoren liegen Methylierungen vor, während die Kontrollgewebe nicht oder sehr schwach methyliert sind. Alle weiteren Methylierungsanalysen beschränken sich hinsichtlich *AATK* daher auf die *downstream* Region.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Methylierungsanalyse von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A*, *RASSF5C* und *RASSF2* in humanen Zelllinien

Zelllinie	Tumorentität/ Gewebe	<i>AATK</i> (<i>upstream</i> TS)	<i>AATK</i> (<i>downstream</i> TS)	<i>DUSP2</i>	<i>RASSF5A</i>	<i>RASSF5C</i>	<i>RASSF2</i>
A549	NSCLC	pm	sm 47%	sm 8%	pm	u	n.a.
A427	NSCLC	pm	sm 32%	sm 8%	m	m	pm
H322	NSCLC	m	pm 86%	m 70%	pm	u	pm 79%
HTB171	SCLC	m	pm 93%	u 3%	m	pm	m 77%
H358	NSCLC	pm	pm 32%	u 4%	pm	u	n.a.
buf 12580	Melanom	pm	n.a.	pm 28%	n.a.	u	n.a.
C8161	Melanom	n.a.	n.a.	u 4%	n.a.	u	n.a.
MeWo	Melanom	pm	n.a.	sm 8%	n.a.	pm	n.a.
IGRI	Melanom	pm	pm 76%	pm 14%	n.a.	u	n.a.
SKMel13	Melanom	pm	u 15%	pm 11%	pm	u	n.a.
SKMel28	Melanom	pm	n.a.	pm 28%	n.a.	sm	n.a.
U209	Sarkom	pm	n.a.	u 6%	pm	u	u 7%
6/53	Sarkom	pm	pm 34%	pm 25%	pm	u	pm 64%
ZR751	Mamma- karzinom	pm	pm 81%	pm 30%	pm	u	m 80%
MCF7	Mamma- karzinom	n.a.	pm 76%	pm 50%	m	u	m 80%
CAOV3	Ovarialkarzinom	pm	n.a.	u 4%	n.a.	u	n.a.
ES2	Ovarialkarzinom	pm	n.a.	pm 13%	n.a.	pm	n.a.
OAW42	Ovarialkarzinom	m	n.a.	pm 43%	n.a.	u	n.a.
OVAR	Ovarialkarzinom	pm	n.a.	pm 11%	n.a.	u	n.a.
SKOV3	Ovarialkarzinom	m	n.a.	pm 13%	n.a.	n.a.	n.a.
HeLaS3	Zervixkarzinom	pm	pm 77%	u 3%	m	m	m 78%
Hep2	Larynxkarzinom	pm	pm 45%	n.a.	u	n.a.	n.a.
Hep2G	Leberkarzinom	pm	n.a.	m 24%	n.a.	n.a.	n.a.
FTC133	Thyroidkarzinom	pm	sm 44%	sm 4%	pm	u	u 3%
Paca2	Pankreas- karzinom	m	pm 34%	sm 4%	m	u	pm 72%
Patu2	Pankreas- karzinom	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
RPMI	Plattenepithel- karzinom	m	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
HEK293T	embryon. Nierenzellen	pm	pm 24%	pm 29%	m	u	sm
HF53	Fibroblasten	sm	n.a.	sm 4%	n.a.	u	n.a.
HF55	Fibroblasten	n.a.	sm 9%	n.a.	sm	n.a.	u 3%
HB2	Brustepithel- zellen	n.a.	n.a.	u	pm	u	u 2%
HOSE	ovariale Oberflächen- epithelzellen	m	n.a.	n.a.	n.a.	u	n.a.

Die Angabe des Methylierungsstatus basiert auf den Ergebnissen der COBRA-Analysen. Die Prozentzahlen stellen quantitative Methylierungswerte dar, die durch Pyrosequenzierung ermittelt wurden. Methylierungen sind grau unterlegt. (NSCL: *non small cell lung cancer*; SCLC: *small cell lung cancer*; u: unmethyliert; m: methyliert; pm: partiell methyliert; sm: schwach methyliert; n.a.: nicht analysiert).

4.1.5 Methylierungsstatus von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* in Primärtumoren unterschiedlicher Krebsentitäten

Neben der Methylierungsanalyse der Gene *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* in humanen Zelllinien wurden auch Primärtumore unterschiedlicher Krebsentitäten mittels COBRA untersucht. In Abbildung 4-7 sind exemplarisch ausgewählte Ergebnisse der COBRA-Analyse dargestellt und in Tabelle 4-2 die vollständigen Daten zusammengefasst. Der Methylierungsstatus der einzelnen analysierten Proben ist dem Anhang zu entnehmen (Tab. 6-1 bis 6-4).

Der Methylierungsstatus der *downstream* des Transkriptionsstarts gelegenen *AATK*-CpG-Insel-Region wurde in unterschiedlichen Lungentumoren, darunter Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome sowie in Mammakarzinomen analysiert (Tab. 4-2; Abb. 4-7). Bei vier von fünf Adenokarzinomen und zwei von acht Plattenepithelkarzinomen liegt die analysierte Region methyliert vor. In kleinzelligen Lungenkarzinomen liegt eine Methylierung bei 4 von 12 Proben vor. Von 30 Mammakarzinom-Proben sind 16 methyliert; vier von 24 Referenz-Brustgewebeproben weisen eine im Vergleich zu den Tumorproben deutlich schwächere Methylierung auf.

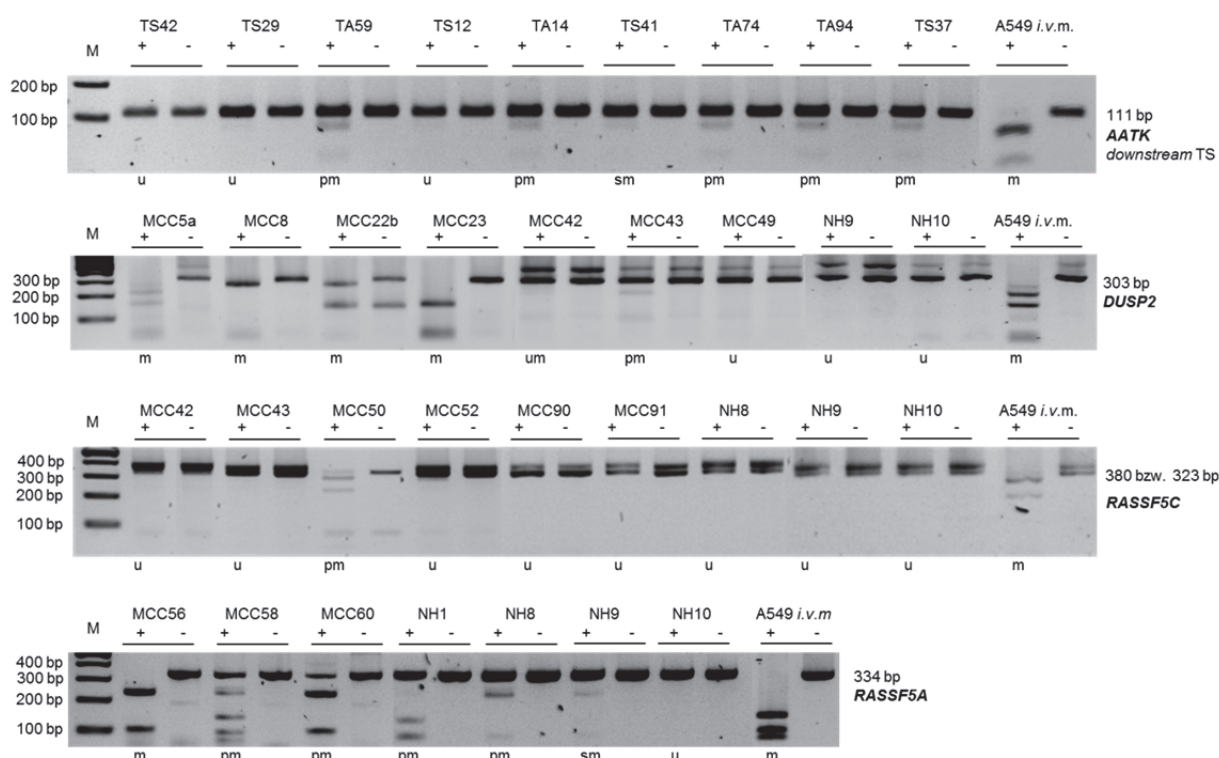


Abbildung 4-7: Methylierungsstatus von *DUSP2*, *AATK*, *RASSF5A* und *RASSF5C* in Primärtumoren unterschiedlicher Krebsentitäten. Der Methylierungsstatus wurde mittels COBRA detektiert. Dazu wurde aus humanen Zelllinien isolierte DNA nach einer Bisulfit-Behandlung mit Gen-spezifischen Primerpaaren amplifiziert und das entstandene PCR-Produkt im Anschluss mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut. Neben dem Restriktionsansatz (+) wurde ein *mock*-Ansatz (-) ohne Enzym mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte zusammen mit einem 100 bp-Marker (M) im 2%-igen Agarosegel. Als Positivkontrolle wurde *in vitro* methylierte (*i.v.m.*), Bisulfit-behandelte A549-DNA verwendet. (BZK: kleinzellige Lungentumore; TS: Plattenepithelkarzinom der Lunge; TA: Adenokarzinom der Lunge; MCC: Merkelzellkarzinom; NH: Nävuszellnävi). Die Daten der *downstream* *AATK*-Region wurden von C. Herkt generiert. (u: unmethyliert, sm: schwach methyliert, pm: partiell methyliert, m: methyliert)

Hinsichtlich der *DUSP2*-Promotormethylierung wurden Merkelzellkarzinome, Phäochromozytome, kleinzellige Lungentumore sowie Mammakarzinome betrachtet. Merkelzellkarzinome sind sehr seltene bösartige Hauttumore, die von den Merkel-Zellen der Oberhaut ausgehen. Phäochromozytome bezeichnen hormonell aktive Tumore des Nebennierenmarks. In den analysierten Mammakarzinomen, einschließlich dem nichttumorösen Referenz-Brustgewebe, den Phäochromozytomen sowie den kleinzelligen Lungentumoren liegt keine Methylierung der *DUSP2*-Promotorregion vor (Tab. 4-2). Von 22 untersuchten Merkelzellkarzinomen weisen 10 eine Methylierung auf; im Kontrollgewebe (Nävuszellnävus= benignes Muttermal) findet sich nur bei einer von zwölf untersuchten Proben eine Methylierung.

Der Promotormethylierungsstatus von *RASSF5A* und *RASSF5C* wurde in Merkelzellkarzinomen und Phäochromozytomen ermittelt (Tab. 4-2; Abb. 4-7). Bei 23 von 33 analysierten Phäochromozytomen ist der *RASSF5A*-Promotor methyliert, während der *RASSF5C*-Promotor in allen Proben unmethyliert ist. 44% (17/39) der Merkelzellkarzinome weisen eine *RASSF5A*-Methylierung auf, allerdings sind 43% der Kontrollgewebeproben ebenfalls methyliert. Bezüglich des *RASSF5C*-Promotors ergab die Analyse, dass zwei von 27 Merkelzellkarzinomen eine Methylierung aufweisen, während alle 11 Kontrollproben unmethyliert sind. Der *RASSF5C*-Promotormethylierungsstatus wurde zusätzlich in kleinzelligen Lungentumoren sowie Ovarialkarzinomen erfasst. Die analysierte Region ist in allen kleinzelligen Lungentumoren unmethyliert; bei zwei der 11 untersuchten Ovarialkarzinome liegt hingegen eine Methylierung vor.

Tabelle 4-2: Methylierungsdaten von *RASSF5A*, *RASSF5C*, *DUSP2* und *AATK* in Primärtumoren unterschiedlicher Krebsentitäten

Tumorentität	<i>RASSF5A</i>	<i>RASSF5C</i>	<i>DUSP2</i>	<i>AATK</i> (downstream TS)
MCC	44% (17/39)	7% (2/27)	45% (10/22)	n.a.
benignes NZN	43% (3/7)	0% (0/11)	8% (1/12)	n.a.
Phäochromozytom	70% (23/33)	0% (0/33)	0% (0/33)	n.a.
SCLC	n.a.	0% (0/13)	0% (0/6)	33% (4/12)
Adeno-KA der Lunge	n.a.	n.a.	n.a.	80% (4/5)
Plattenepithel-KA der Lunge	n.a.	n.a.	n.a.	25% (2/8)
Mammakarzinom	n.a.	n.a.	0% (0/12)	53% (16/30)
gesundes Brustgewebe	n.a.	n.a.	0% (0/6)	17% (4/24)
Ovarialkarzinom	n.a.	18% (2/11)	n.a.	n.a.

Die Daten basieren auf den Ergebnissen der COBRA-Analyse. (MCC: Merkelzellkarzinom; NZN: Nävuszellnävus; SCLC: *small cell lung cancer*; KA: Karzinom; n.a.: nicht analysiert; sm: schwach methyliert; TS: Transkriptionsstart).

Zusammenfassend ergab die Methylierungsanalyse, dass die CpG-Insel-Promotorregionen von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* auch in Primärtumoren hypermethyliert sind.

4.2 Analyse des Einflusses der Promotor-Methylierung von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* auf die RNA-Expression

Im Rahmen der RNA-Expressionsanalyse wurde untersucht, ob die Promotorhypermethylierung der Gene *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* in humanen Zelllinien mit einer verringerten RNA-Expression der jeweiligen Gene korreliert. Führt die Promotor-methylierung zu einer verringerten RNA-Expression, sollte die Inhibierung der DNA-Methyltransferase durch 5-Aza-2'-dCytidine (Aza) die Reaktivierung des Gens und folglich die RNA-Reexpression induzieren. Um dies zu analysieren, wurden ausgewählte Zelllinien über vier Tage mit unterschiedlichen Aza-Konzentrationen (0 μ M, 5 μ M und 10 μ M) behandelt und im Anschluss die RNA-Expression von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* mittels qualitativer (semi-quantitativer) und zum Teil quantitativer Reverser-Transkriptase-PCR (RT-PCR) analysiert. Um gewährleisten zu können, dass gleiche Mengen an RNA zum Einsatz kamen, wurde eine RT-PCR für das *housekeeping*-Gen β -Aktin durchgeführt bzw. bei der quantitativen RT-PCR auf β -Aktin normalisiert.

In den Zelllinien H322 und HEK, die beide einen methylierten bzw. partiell methylierten *DUSP2*-Promotor besitzen, wird *DUSP2* nicht bzw. schwach exprimiert (Abb. 4-8a). Die Behandlung mit Aza führt zur Reexpression von *DUSP2*, wobei in H322-Zellen eine zunehmende Expression mit steigender Aza-Konzentration korreliert (Abb. 4-8a und b). Ebenfalls wird *DUSP2* in der partiell methylierten Zelllinie ZR751 in unbehandelten Zellen nur schwach exprimiert und nach Behandlung mit 10 μ M Aza reexprimiert. Die beiden Zelllinien H358 und HeLa, in denen der *DUSP2*-Promotor unmethyliert vorliegt, weisen eine *DUSP2*-Expression in unbehandelten Zellen auf und werden von der Aza-Behandlung nicht beeinflusst. Für die Zelllinie H322 wurde neben der *DUSP2*-RNA-Expression auch die *DUSP2*-Promotormethylierung nach Aza-Behandlung analysiert, um die Demethylierung mittels Aza nachzuweisen. Beide untersuchten Regionen im *DUSP2*-Promotorbereich (*upstream* des Transkriptionsstarts und unmittelbar davor) weisen nach Behandlung mit 5 μ M Aza eine geringere Methylierung auf (Abb. 4-8c). Die Erhöhung der Aza-Konzentration auf 10 μ M verstärkt die Demethylierung nicht.

Keine bzw. eine verminderte Expression von *AATK* kann in unbehandelten HeLa-, A549- und H322-Zellen beobachtet werden (Abb. 4-8a). Nach Behandlung mit 5 μ M Aza kommt es zur *AATK*-Reexpression (Abb. 4-8a und b). Erhöhung der Aza-Konzentration führt in H322-Zellen nicht zu einer Steigerung der *AATK*-Expression (Abb. 4-8b). Unbehandelte FTC-133-Zellen, die über einen unmethylierten *AATK*-Promotor verfügen, exprimieren *AATK* vergleichsweise stark. Eine Demethylierung infolge der Aza-Behandlung (5 μ M) kann in H322 beobachtet werden (Abb. 4-8c). Die Steigerung der Aza-Konzentration führt nicht zur verstärkten Demethylierung.

Eine *RASSF5C*-Reexpression nach Aza-Behandlung liegt in A427 Zellen vor, die einen methylierten *RASSF5C*-Promotor besitzen (Abb. 4-8a). HeLa-Zellen, die ebenfalls über einen methylierten *RASSF5C*-Promotor verfügen, exprimieren *RASSF5C* schwach und zeigen keine Reexpression nach Aza-Behandlung. Die einen unmethylierten *RASSF5C*-Promotor aufweisende Zelllinie A549 exprimiert *RASSF5C* und ist unbeeinflusst von einer Aza-Behandlung.

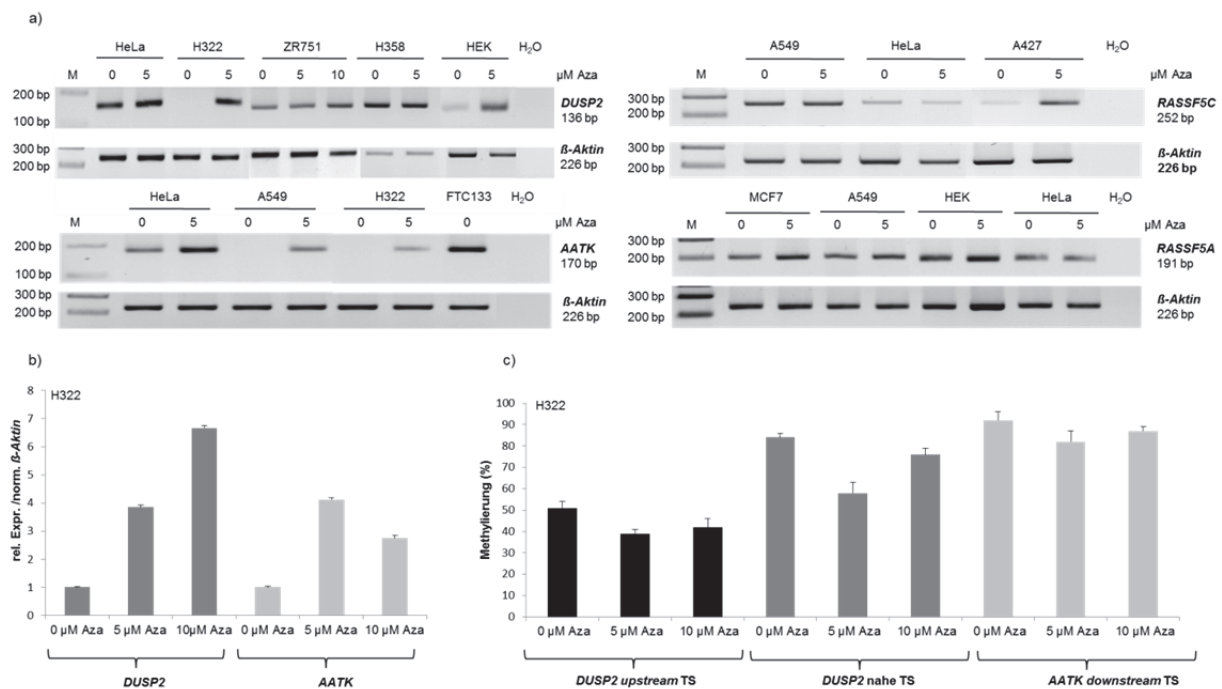


Abbildung 4-8: Korrelation zwischen Promotormethylierung und verminderter RNA-Expression von *DUSP2*, *AATK*, *RASSF5A* und *RASSF5C*. a) Aus zuvor, über vier Tage mit unterschiedlichen 5-Aza-dC (Aza)-Konzentrationen (0, 5, 10 μ M) behandelten humanen Zelllinien wurde die RNA isoliert und mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren eine RT-PCR durchgeführt. Der Expressionsnachweis wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht. Eine RT-PCR mit dem *housekeeping*-Gen β -Aktin wurde durchgeführt, um nachweisen zu können, dass äquivalente Mengen an cDNA amplifiziert wurden. b) Quantitative Bestimmung der *DUSP2*- und *AATK*-RNA-Expression nach Aza-Behandlung (siehe a) von H322-Zellen mittels qRT-PCR. Die Gen-spezifischen Expressionen wurden auf β -Aktin normalisiert und die Expression unbehandelter Zellen gleich 1 gesetzt. Für die Auswertung wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten berücksichtigt, wobei jeweils in Triplikaten gemessen wurde. c) Nachweis der Demethylierung im *DUSP2*- und *AATK*-Promotorbereich nach Aza-Behandlung von H322-Zellen mittels Pyrosequenzierung. Parallel zur RNA wurde DNA aus den Aza-behandelten H322-Zellen isoliert, Bisulfit-behandelt, mit Gen-spezifischen Primern (biotinylierter *Reverse*-Primer) amplifiziert und Pyro-sequenziert. Der Methylierungsstatus stellt den prozentualen Durchschnittswert der Methylierungsgrade der analysierten CpG-Dinukleotide dar. Die Pyrosequenzierung wurde jeweils dreimal durchgeführt und die Daten gemittelt.

RASSF5A wird in allen analysierten Zelllinien mit methylierter Promotorregion exprimiert (Abb.4-8a). Eine deutliche Steigerung der Expression nach Aza-Behandlung ist in keiner der Zelllinien erkennbar. Minimale reexprimierende Effekte sind für MCF7- und A549-Zellen detektierbar.

Zusammenfassend konnte für *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* eine Korrelation zwischen Promotormethylierung und verringerter RNA-Expression festgestellt werden.

4.3 Einfluss von *AATK* und *RASSF5C* auf die Kolonieformation in Krebszelllinien

Der Einfluss von *AATK* und *RASSF5C* auf das Zellwachstum von Krebszellen bzw. auf die Ausbildung von Kolonien wurde mittels *Colony Formation Assays* erfasst. Dazu wurden Krebszelllinien mit methyliertem Promotor mit einem *mAATK*- bzw. *RASSF5C*-Überexpressionsvektor und in einem Kontrollansatz mit dem dazugehörigen Leervektor transfiziert und über ca. vier Wochen mit G418 selektioniert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit Giemsa gefärbt und ausgezählt. Die Überexpression von *mAATK* und *RASSF5C* wurde mittels RT-PCR kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression von *AATK* führt sowohl in HeLa- als auch in H322-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der gebildeten Kolonien (Abb. 4-9). Das Wachstum von HeLa-Zellen wurde um 50%, das von H322-Zellen um 42% inhibiert. Eine supprimierende Wirkung von *RASSF5C* auf das Tumorstwachstum konnte weder in HeLa (Abb. 4-9) noch in A427 (Daten nicht gezeigt) gefunden werden. In HeLa wurde hingegen eine Zunahme an Kolonien nach einer ectopischen *RASSF5C*-Überexpression nachgewiesen (Abb. 4-9). Für *DUSP2* und *RASSF2* wurden keine *Colony Formation Assays* durchgeführt, da für beide Gene bereits eine tumorsupprimierende Wirkung in der Literatur beschrieben wurde (Lin *et al.*, 2011; Schagdurasurengin *et al.* 2010).

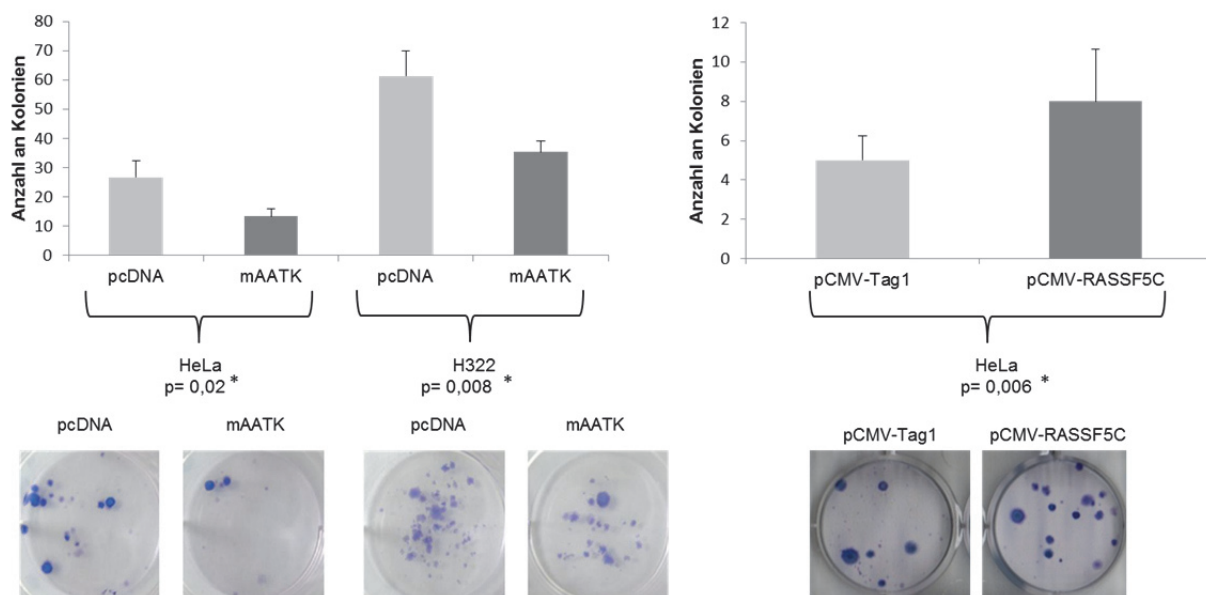


Abbildung 4-9: Einfluss von *AATK* und *RASSF5C* auf die Kolonieformation in Zelllinien mit methyliertem *AATK*- bzw. *RASSF5C*-Promotor. Humane Zellen wurden mit einem Überexpressionsvektor (pcDNA3.1(+)-mAATK bzw. pCMV-RASSF5C) und in einem Kontrollansatz mit dem zugehörigen Leervektor (pcDNA bzw. pCMV-Tag1) transfiziert und über ca. 4 Wochen mit G-418 selektioniert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit Giemsa gefärbt und ausgezählt. Das Ergebnis der Auszählung aus Triplikaten, inklusive Signifikanz (*; berechnet mit GraphPad *t test calculator*), ist grafisch abgebildet. Beispielhaft ist jeweils eines der Triplikate bildlich dargestellt. Die Daten für *AATK* wurden von C. Herkt generiert.

Zusammengefasst konnte mittels *Colony Formation Assay* eine tumorsupprimierende Wirkung für *AATK*, nicht aber für *RASSF5C* detektiert werden.

4.4 Einfluss von CTCF auf *DUSP2*, *AATK* und Mitglieder der *RASSF*-Familie

Diverse Daten in der Literatur weisen darauf hin, dass der multifunktionale Faktor CTCF (*CCCTC-binding factor*) auch in die Regulation von Tumorsuppressorgenen (TSG) involviert ist (Méndez-Catalá *et al.*, 2013; De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007; Witcher & Emerson, 2009; Soto-Reyes & Recillas-Targa, 2010; Filippova *et al.*, 2002), wobei unter Anderem fehlerhafte CTCF-Modifikationen wie SUMOylierung und PARYlierung eine Rolle zu spielen scheinen (MacPherson *et al.*, 2009; Witcher & Emerson, 2009). Aufgrund dieser

Beobachtungen wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit der Einfluss von CTCF auf Mitglieder der *RASSF*-Familie sowie auf *AATK* und *DUSP2* analysiert.

4.4.1 Einfluss transienter CTCF-Überexpression auf die RNA-Expression von *DUSP2*, *AATK* und Mitglieder der *RASSF*-Familie

Es wurde die RNA-Expression der *RASSF*-Familienmitglieder *RASSF2*, *RASSF5A*, *RASSF5C* und *RASSF10* sowie von *AATK* und *DUSP2* nach 48 stündiger transienter Überexpression mit chCTCF bzw. dem korrespondierenden Leervektor mittels qualitativer RT-PCR in Zelllinien mit methyliertem Promotor der zuvor aufgeführten Gene analysiert. Bei Vorlage einer durch CTCF-Überexpression hervorgerufenen Änderung der Kandidaten-RNA-Expression wurde zusätzlich die RNA-Expression in Zelllinien mit unmethyliertem Promotorbereich der Kandidatengene betrachtet. Es wurde CTCF aus *Gallus gallus* überexprimiert, um den reinen Einfluss der Überexpression durch Unterscheidung zu endogenem, humanem CTCF besser erfassen zu können. Das Kernprotein ist in den beiden Organismen hochkonserviert; die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz im gesamten Protein beträgt 93% (*Alignment* mit Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)).

Die RNA-Expression von *RASSF10* und *RASSF2* wird in HeLa-Zellen von der transienten CTCF-Überexpression mit zwei unterschiedlichen chCTCF-Überexpressionsvektoren nicht beeinflusst (Abb. 4-10a). Die *RASSF5C*-RNA-Expression hingegen nimmt nach CTCF-Überexpression deutlich zu, wobei der Effekt bei Transfektion mit pEGFP-chCTCF im Vergleich zu pcDNA3-chCTCF ausgeprägter ist. Dies konnte mittels qRT-PCR verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). In A549-Zellen, in denen der *RASSF5C*-Promotor unmethyliert vorliegt, ist keine Änderung des *RASSF5C*-RNA-Levels zu beobachten (Abb. 4-10d). Die Ergebnisse der qualitativen RT-PCR zeigen für *RASSF5A* nach Transfektion mit pcDNA3-chCTCF in HeLa-Zellen keine Änderung der *RASSF5A*-RNA-Expression, während die Überexpression mit pEGFP-chCTCF zu einem geringen Anstieg des *RASSF5A*-RNA-Levels führt (Abb. 4-10a), der jedoch mittels qRT-PCR nicht bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Sowohl *DUSP2* als auch *AATK* weisen infolge einer CTCF-Überexpression in H322-Zellen mit methylierter *AATK*- und *DUSP2*-Promotorregion eine gesteigerte RNA-Expression auf, wobei der Effekt für *AATK* nur nach pEGFP-chCTCF-Überexpression deutlich detektierbar ist (Abb. 4-10b). In Zelllinien mit unmethyliertem *AATK*- oder *DUSP2*-Promotor ist keine Änderung der *AATK*- oder *DUSP2*-RNA-Expression nach CTCF-Überexpression erkennbar (Abb. 4-10c, e).

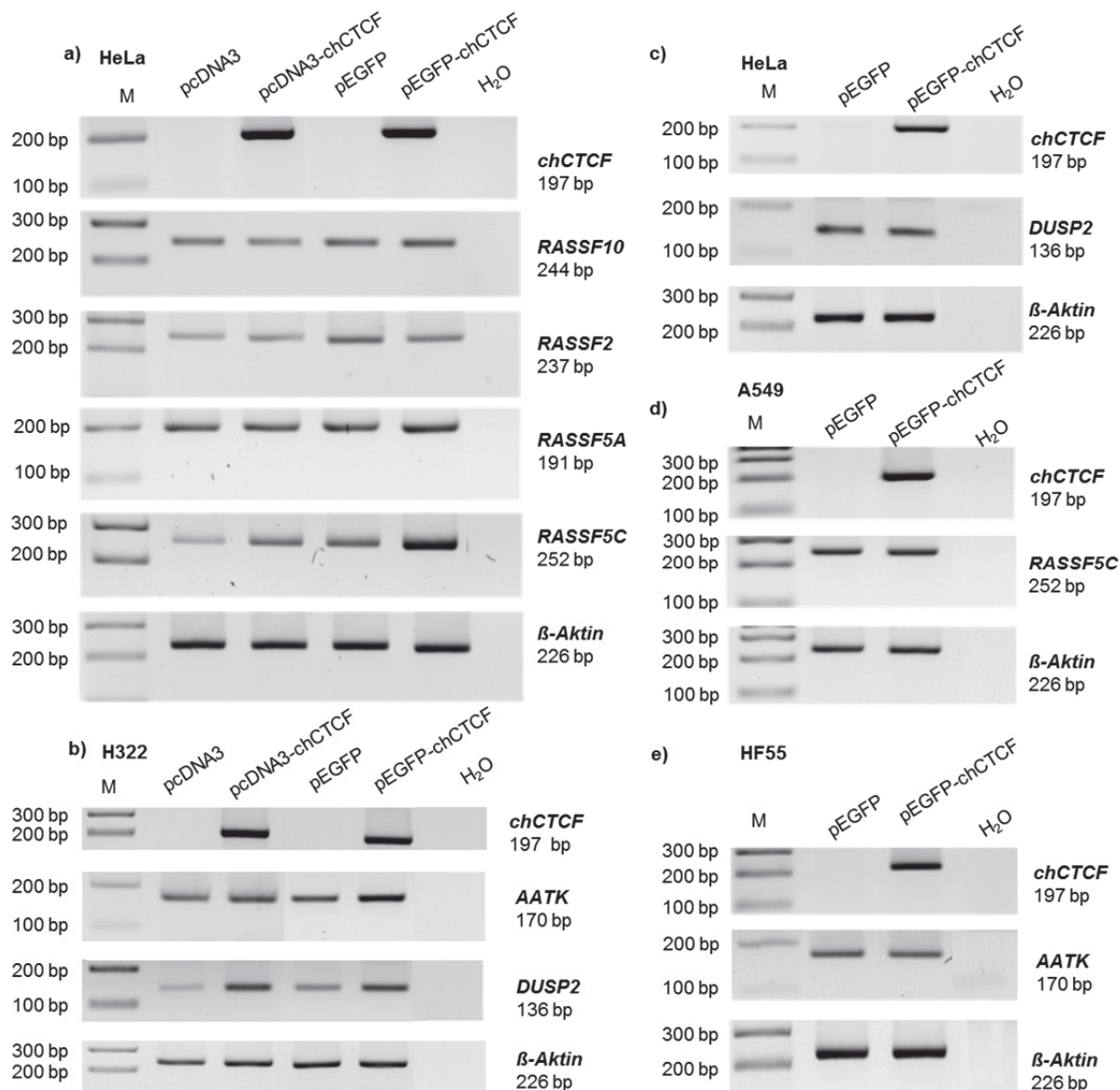


Abbildung 4-10: Einfluss transienter CTCF-Überexpression auf die RNA-Expression von RASSF-Familienmitgliedern sowie DUSP2 und AATK in Zelllinien mit methyliertem (a-b) und unmethyliertem (c-e) Promotor. HeLa-, H322-, A549- und HF55-Zellen wurden mit chCTCF-Überexpressionsvektoren (pcDNA3-chCTCF oder pEGFP-chCTCF) oder dem jeweiligen Leervektor transfiziert, die RNA nach 2 d isoliert und mittels Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Durchführung einer RT-PCR mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren. Der Expressionsnachweis wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht. Eine RT-PCR mit dem housekeeping-Gen β -Aktin wurde durchgeführt, um nachweisen zu können, dass äquivalente Mengen an cDNA amplifiziert wurden.

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass eine transiente Überexpression von CTCF die RNA-Expression von AATK, DUSP2 und RASSF5C methylierungsabhängig induziert. Bei Vorlage eines jeweils methylierten Promotors, wird die RNA-Expression der zuvor genannten Gene gesteigert, während dies im Falle eines jeweils unmethylierten Promotors nicht der Fall ist. RASSF5A und RASSF10 werden von einer CTCF-Überexpression nicht beeinflusst.

4.4.2 Einfluss transienter Überexpression einzelner CTCF-Domänen sowie von CTCF-Modifikationen auf die RNA-Expression von *DUSP2*, *AATK* und *RASSF5C*

Um zu analysieren, welche CTCF-Domänen für die zuvor beobachtete Steigerung der RNA-Expression von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* nach transienter CTCF-Überexpression verantwortlich sind, wurden chCTCF-Konstrukte, die nur den C-, N-Terminus oder die Zinkfingerdomäne beinhalten über 48 h transient in Zelllinien überexprimiert, die eine methylierte *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*- Promotorregion besitzen. Im Anschluss wurde die RNA-Expression der zuvor erwähnten Gene mittels qualitativer oder quantitativer RT-PCR analysiert und mit der RNA-Expression nach *full lenght* CTCF bzw. Leervektor-überexpression verglichen. Die gleichmäßige Überexpression der einzelnen Konstrukte wurde mittels qualitativer RT-PCR kontrolliert (Abb. 4-11b,c,e) und die Stabilität der Proteine im Vorfeld per WesternBlot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

In H322-Zellen, die einen vollständig methylierten *DUSP2*- und einen stark methylierten *AATK*-Promotor besitzen, führt die Überexpression von *full lenght* CTCF zu einer fast zweifach gesteigerten *DUSP2*-RNA-Expression und einer etwa um das Vierfache erhöhten *AATK*-Expression (Abb. 4-11a). Die alleinige Überexpression des CTCF-C-Terminus oder der Zinkfingerdomäne resultiert verglichen mit *full lenght* CTCF in einer verminderten *DUSP2*- und *AATK*-RNA-Expression (Abb. 4-11a und Abb. 6-3 Anhang). Der CTCF-N-Terminus allein führt bei *DUSP2* zu einem ähnlichen RNA-Level, wie *full lenght* CTCF, während die *AATK*- Expression leicht absinkt (Abb. 4-11a). In HEK-Zellen, die nur über einen partiell methylierten (29% Methylierung) *DUSP2*-Promotor verfügen, ist die Steigerung der *DUSP2*-RNA-Expression nach *full lenght* CTCF Überexpression geringer als in H322-Zellen mit vollständig methyliertem *DUSP2*-Promotor (Abb. 4-11d). Eine Reexpression von *AATK* nach *full lenght* CTCF-Überexpression ist in HEK-Zellen, die im *AATK*-Promotorbereich nur partiell methyliert sind (24% Methylierung), nicht erkennbar (Abb. 4-11d). Hinsichtlich der *RASSF5C*-Expression hat die alleinige Überexpression der CTCF-Zinkfingerdomäne in einer Zelllinie mit methyliertem *RASSF5C*-Promotor (HeLa) keine Wirkung (Daten nicht gezeigt). Der CTCF N-Terminus hat etwa die gleiche Steigerung der *RASSF5C*-RNA-Expression zu Folge, wie *full lenght* CTCF, während der CTCF-C-Terminus alleine dies nicht bewerkstelligt, erkennbar an einer reduzierten *RASSF5C*-RNA-Expression (Abb. 4-11c).

Der Einfluss von CTCF-Modifikationen, wie PARYlierung und SUMOylierung wurde ebenfalls analysiert. Zum Einen wurden chCTCF-Konstrukte mit mutierter SUMOylierungsstelle im C- oder N-Terminus und deletierter PARYlierungsstelle im N-Terminus hergestellt, transient in Zellen mit methylierter *AATK*-, *DUSP2*-, oder *RASSF5C*-Promotorregion transfiziert und der Einfluss auf die *AATK*-, *DUSP2*-, und *RASSF5C*-Expression mittels qualitativer und/oder quantitativer RT-PCR analysiert. Zum Anderen erfolgten Expressionsanalysen von *AATK*-, *DUSP2*-, und *RASSF5C* nach Überexpression von SUMO 1-3 (*Small ubiquitin-related modifier*) oder PARG (*polyADP-ribose glycohydrolase*), was zur Degradation von PARP (*poly-(ADP-ribose) polymerase*), dem ausführenden Enzym der PARYlierung, führt. Des Weiteren wurde die PARYlierung durch Einsatz von 3-Aminobenzamid (ABA) inhibiert und im Anschluss die Expression von *AATK*-, *DUSP2*-, und *RASSF5C* betrachtet.

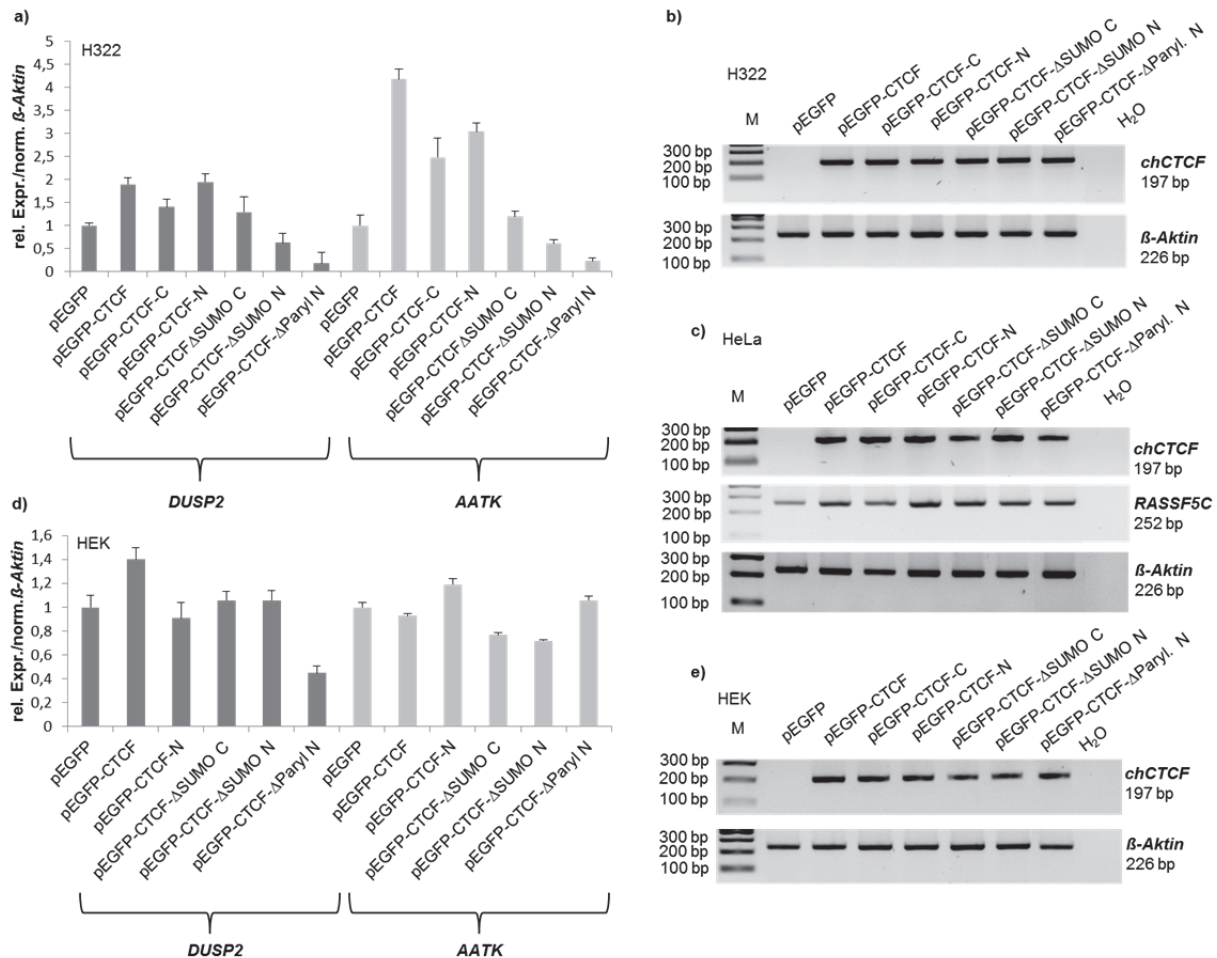


Abbildung 4-11: Einfluss transients Überexpression einzelner CTCF-Domänen sowie von CTCF-Modifikationen auf die RNA-Expression von *DUSP2*, *AATK* und *RASSF5C*. Zelllinien mit methylierter oder partiell methylierter *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C*-Promotorregion wurden mit chCTCF-Konstrukten, die nur einzelne chCTCF-Domänen enthalten (pEGFP-CTCF-N-, pEGFP-CTCF-C) oder chCTCF-Konstrukten mit mutierten SUMOylierungsstellen (pEGFP-CTCF- Δ SUMO C, pEGFP-CTCF- Δ SUMO N) oder deletierter PARYlierungsstelle (pEGFP-CTCF- Δ PARYL N) sowie *full length* CTCF und einer Leervektorkontrolle transient transfiziert. Nach 2 d folgte die RNA-Isolation und die Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkription und die Amplifikation mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren. Der Expressionsnachweis wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel (b,c,e) oder mittels quantitativer RT-PCR erbracht (a,d). Für die qualitativen Expressionsanalysen wurde eine RT-PCR mit dem *housekeeping* Gen β -Aktin durchgeführt, um nachweisen zu können, dass äquivalente Mengen an cDNA amplifiziert wurden. Im Falle der quantitativen Expressionsanalysen wurden die Gen-spezifischen Expressionen auf β -Aktin normalisiert und die Expression Leervektor-transfizierter Zellen gleich 1 gesetzt (a,d). Es wurden jeweils Triplikate bestimmt und die Daten aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Die Proteininstabilität der Deletions- bzw. Mutationskonstrukte wurde im Vorfeld mittels WesternBlot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression der CTCF-Mutations- bzw. Deletionskonstrukte führt in H322-Zellen mit vollständig methyliertem *DUSP2*- und stark methyliertem *AATK*-Promotor nach zwei Tagen zur Inhibition der *DUSP2*- und *AATK*-Expression jeweils verglichen mit der Expression nach *full length* CTCF-Transfektion (Abb. 4-11a). Die Deletion der PARYlierungsstelle im N-Terminus von CTCF resultiert in der stärksten Abnahme der *AATK*- und *DUSP2*-Expression. Von den beiden Mutationen der CTCF-SUMOylierungsstellen weist diejenige im N-Terminus den stärker inhibierenden Effekt auf. In HEK-Zellen mit nur partiell methyliertem *DUSP2*-Promotor (29% Methylierung) sind die inhibierenden Effekte auf die *DUSP2*-RNA-Expression nach Überexpression der CTCF-Deletions- bzw. Mutationskonstrukte deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 4-11d). Die Deletion der PARYlierungsstelle im chCTCF-N-Terminus weist mit dem Faktor 0,5 den stärksten inhibierenden Effekt auf. Die Mutationen in den CTCF-SUMOylierungsstellen reduzieren die *DUSP2*-RNA-Expression verglichen zum *full length* CTCF etwa um den

Faktor 0,4. Vergleicht man die Überexpression des N-Terminus mit der, des im N-Terminus mutierten SUMOylierungsstelle, fällt auf, dass die Mutation der SUMOylierungsstelle einen weniger reprimierenden Effekt auf die *DUSP2*-Expression hat. Die Überexpression von *full length* CTCF in HEK-Zellen mit partiell methyliertem Promotor (24% Methylierung) hat, wie bereits erwähnt, keinen nennenswerten Effekt auf die *AATK*-Expression (Abb. 4-11d). Demnach sind die Auswirkungen nach Überexpression der Deletions- bzw. Mutationskonstrukte nur schwach ausgeprägt bzw. nicht vorhanden. Die Mutationen in den CTCF-SUMOylierungsstellen reduzieren die *AATK*-Expression etwa um den Faktor 0,2 verglichen mit dem *full length* CTCF-Konstrukt; die Deletion der PARYlierungsstelle erhöht die *AATK*-Expression minimal. Die Auswirkung der Überexpression der CTCF-Deletions- und Mutationskonstrukte auf die *RASSF5C*-Expression wurde qualitativ in der Zelllinie HeLa untersucht, da diese eine methylierte CpG-Insel-Promotorregion aufweist. Es konnten jedoch keine größeren Veränderungen der *RASSF5C*-Expression im Vergleich mit dem CTCF *full length* Konstrukt festgestellt werden (Abb. 4-11c).

Um den reprimierenden Effekt der fehlenden PARYlierung von CTCF zu verifizieren, wurde die PARYlierung durch PARG-Überexpression oder Behandlung mit 3-Aminobenzamid (ABA) inhibiert. Die *RASSF5C*- sowie die *AATK*-Expression werden weder von der ABA-Behandlung noch von der PARG-Überexpression beeinflusst (Abb. 4-12a,b), wobei dies unabhängig vom Methylierungsstatus ist. Die *DUSP2*-Expression weist nach PARG-Überexpression in HeLa-Zellen mit methyliertem *DUSP2*-Promotor und nach ABA-Behandlung in HEK-Zellen mit partiell methyliertem *DUSP2*-Promotor keine Änderung im Vergleich zum Kontrollansatz auf (Abb. 4-12a,b). Die ABA-Behandlung in HeLa-Zellen führt zu einer Steigerung der *DUSP2*-Expression (Abb. 4-12a). Dieser Befund konnte aber mittels quantitativer RT-PCR nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

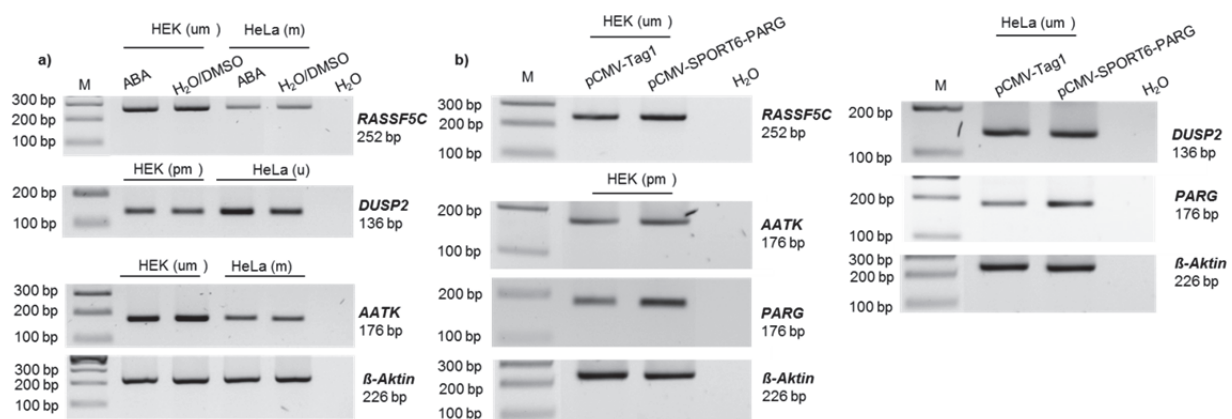


Abbildung 4-12: *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*-RNA-Expression nach inhibierter PARYlierung. a) HEK- und HeLa-Zellen wurden mit 3-Aminobenzamid (ABA) in einer Endkonzentration von 5 mM in DMSO gelöst über einen Zeitraum von 24 h behandelt bzw. als Kontrolle unbehandelt belassen oder mit PARG (*polyADP-ribose glycohydrolase*) oder der passenden Leervektorkontrolle über 48 h transfiziert (b). Im Anschluss folgte die RNA-Isolation und die Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkription und die Amplifikation mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren. Der Expressionsnachweis wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht. Zusätzlich wurde eine RT-PCR mit dem *housekeeping* Gen *β-Aktin* durchgeführt, um nachweisen zu können, dass äquivalente Mengen an cDNA amplifiziert wurden. Der Methylierungsstatus der untersuchten Gene in den beiden Zelllinien ist jeweils angegeben (um: unmethyliert, pm: partiell methyliert; m: methyliert).

Der Einfluss der SUMOylierung auf die RNA-Expression von *DUSP2* wurde nach Überexpression einzelner SUMOs (1-4) sowie einer Kombination aus SUMO 1-3 in H322-Zellen mit methyliertem *DUSP2*-Promotor erfasst. Die Überexpression von SUMO2 und SUMO3 führt zu einer erhöhten *DUSP2*-RNA-Expression, während SUMO1 und SUMO4

keinen starken Effekt haben (Abb. 4-13a), wobei die vergleichsweise starke *β-Aktin*-Expression des Leervektorkonstrukts zu beachten ist. Wiederholungsexperimenten zufolge beschränkt sich der Effekt nur auf SUMO2 und SUMO3 (Daten nicht gezeigt). Die Kombination aus SUMO1-3 zu gleichen Teilen hat ebenfalls einen verstärkenden Effekt auf die *DUSP2*-Expression (Abb. 4-13b). Die Co-Transfektion von chCTCF und der Kombination aus SUMO1-3 führt nicht zu einem synergistischen Effekt, der die *DUSP2*-Expression steigert (Abb. 4-13b).

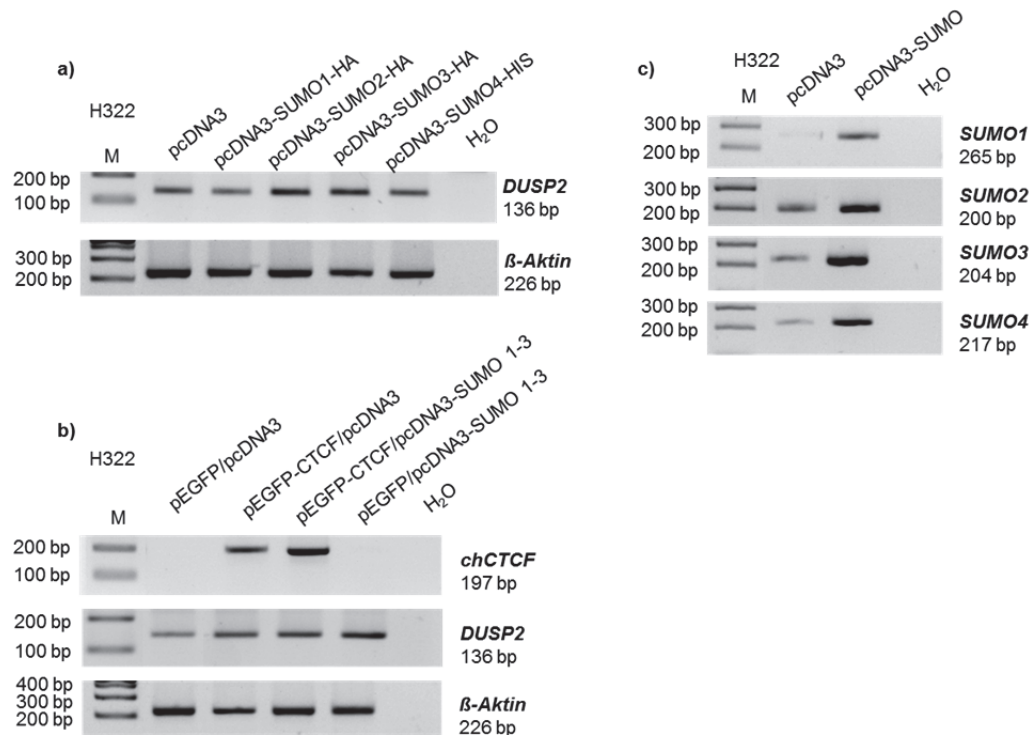


Abbildung 4-13: Wirkung unterschiedlicher SUMO-Überexpressionen auf die RNA-Expression von *DUSP2*. H322-Zellen wurden mit SUMO1-4 (a,c) oder einer Kombination aus SUMO 1-3 (b) zusammen (zu gleichen Teilen) mit oder ohne chCTCF und den entsprechenden Leervektorkontrollen über 48 h transfiziert. Im Anschluss folgte die RNA-Isolation und die Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkription und die Amplifikation mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren. Der Expressionsnachweis wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht. Zusätzlich wurde eine RT-PCR mit dem *housekeeping* Gen *β-Aktin* durchgeführt, um nachweisen zu können, dass äquivalente Mengen an cDNA amplifiziert wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der CTCF-N-Terminus den größten Anteil an der Steigerung der *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C*-Expression nach CTCF-Überexpression ausmacht. Das Fehlen der SUMOylierungsstellen und der PARYlierungsstelle von CTCF führt in Zellen mit methyliertem *AATK* bzw. *DUSP2*-Promotor zu inhibierter *AATK* bzw. *DUSP2*-RNA-Expression, wobei die fehlende PARYlierungsstelle den stärksten reprimierenden Effekt bewirkt. Die *RASSF5C*-Expression bleibt unbeeinflusst. Die reprimierende Wirkung der deletierten CTCF-PARYlierungsstelle auf die *DUSP2*- und *AATK*-RNA-Expression konnte jedoch durch weitere Experimente, bei der die PARYlierung inhibiert wurde, nicht bestätigt werden. Ein Einfluss der SUMOylierung von CTCF auf die *DUSP2*-RNA-Expression hingegen konnte durch reverse Experimente, d.h. SUMO-Überexpression, verifiziert werden. Ein synergistischer Effekt von chCTCF und SUMO-Überexpression wurde nicht beobachtet.

4.4.3 Einfluss transienter Überexpression von *full length* CTCF, einzelner CTCF-Domänen sowie von CTCF-Modifikationen auf die Promotor-Methylierung von *DUSP2*, *AATK* und *RASSF5C*

Die durch CTCF-Überexpression beobachtete verstärkte RNA-Expression von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* bei Vorlage einer methylierten Promotorregion der zuvor genannten Gene wirft die Hypothese auf, dass CTCF eine Demethylierung der Promotorregion der stillgelegten Gene bewirkt, in dessen Folge es zur Reexpression der betroffenen Gene kommt. Um dies zu prüfen, wurden Zelllinien mit methylierter *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C*-Promotorregion mit *full length* chCTCF, chCTCF-Konstrukten, die nur einzelne chCTCF-Domänen enthalten oder chCTCF-Konstrukten mit mutierten SUMOylierungsstellen oder deletierter PARylierungsstelle sowie entsprechender Leervektorkontrolle transient transfiziert. Nach 48 h wurde die DNA, parallel zur RNA (siehe Punkt 4.4.2) isoliert, Bisulfit-behandelt und mittels Pyrosequenzierung oder COBRA der Methylierungsstatus der *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*-Promotorregion erfasst. Die prozentualen Methylierungslevel von *AATK* und *DUSP2* wurden qualitativ und quantitativ bestimmt, während sich für *RASSF5C* die Analyse auf COBRA beschränkte. Keines der untersuchten Gene weist in der jeweiligen Promotorregion Änderungen im Methylierungsgrad nach Überexpression sämtlicher CTCF-Konstrukte, verglichen mit dem Leervektor auf, die durch COBRA detektiert werden können. Beispielhaft sind die COBRA-Analysen des *DUSP2*- und *RASSF5C*-Promotors in Abbildung 4-14 d und f dargestellt. In der *DUSP2*-Promotorregion wurden mittels Pyrosequenzierung zwei unterschiedliche Regionen analysiert; eine Region unmittelbar vor dem Transkriptionsstart mit 7 CpGs und eine *upstream* davon, 5 CpGs umfassend. Beide Bereiche besitzen jeweils eine CTCF-Bindestelle. Betrachtet man die Mittelwerte der analysierten Regionen in H322-Zellen, ist festzustellen, dass der Bereich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart fast vollständig methyliert ist, während die Methylierung *upstream* des Transkriptionsstarts im Mittel 55% beträgt (Abb. 4-14 a und b). Eine Überexpression aller chCTCF-Konstrukte beeinflusst die Region vor dem Transkriptionsstart nicht, *upstream* verringert sich die durchschnittliche Methylierung der fünf analysierten CpGs bei allen Konstrukten signifikant um ca. 3% (*full length* CTCF $p=0,03$; CTCF-C $p=0,05$; CTCF-N $p=0,01$) verglichen mit dem Leervektor, was hauptsächlich auf die abnehmende Methylierung von CpG4 zurückzuführen ist. Die Methylierung dieses CpGs nimmt nach Überexpression von *full length* CTCF, des C- und N-Terminus sowie des Konstruktes mit mutierter SUMOylierungsstelle im CTCF-C-Terminus um etwa 10% ab. Bei fehlender SUMOylierungsstelle im N-Terminus sowie deletierter PARylierungsstelle ist dieser demethylierende Effekt nicht vorzufinden. Das innerhalb der CTCF-Bindestelle gelegene CpG2 weist in dieser Region im Vergleich zu allen anderen CpGs eine 30-37% stärkere Methylierung auf. Nach *full length* chCTCF-Überexpression nimmt an diesem CpG die Methylierung um 3% ab. Demethylierende Effekte in diesem Bereich zwischen 2% und 4% sind für alle Konstrukte detektierbar. In HEK-Zellen sind durch CTCF-Überexpression hervorgerufene demethylierende, reproduzierbare Effekte im *DUSP2*-Promotor nicht festzustellen (Abb. 4-14c).

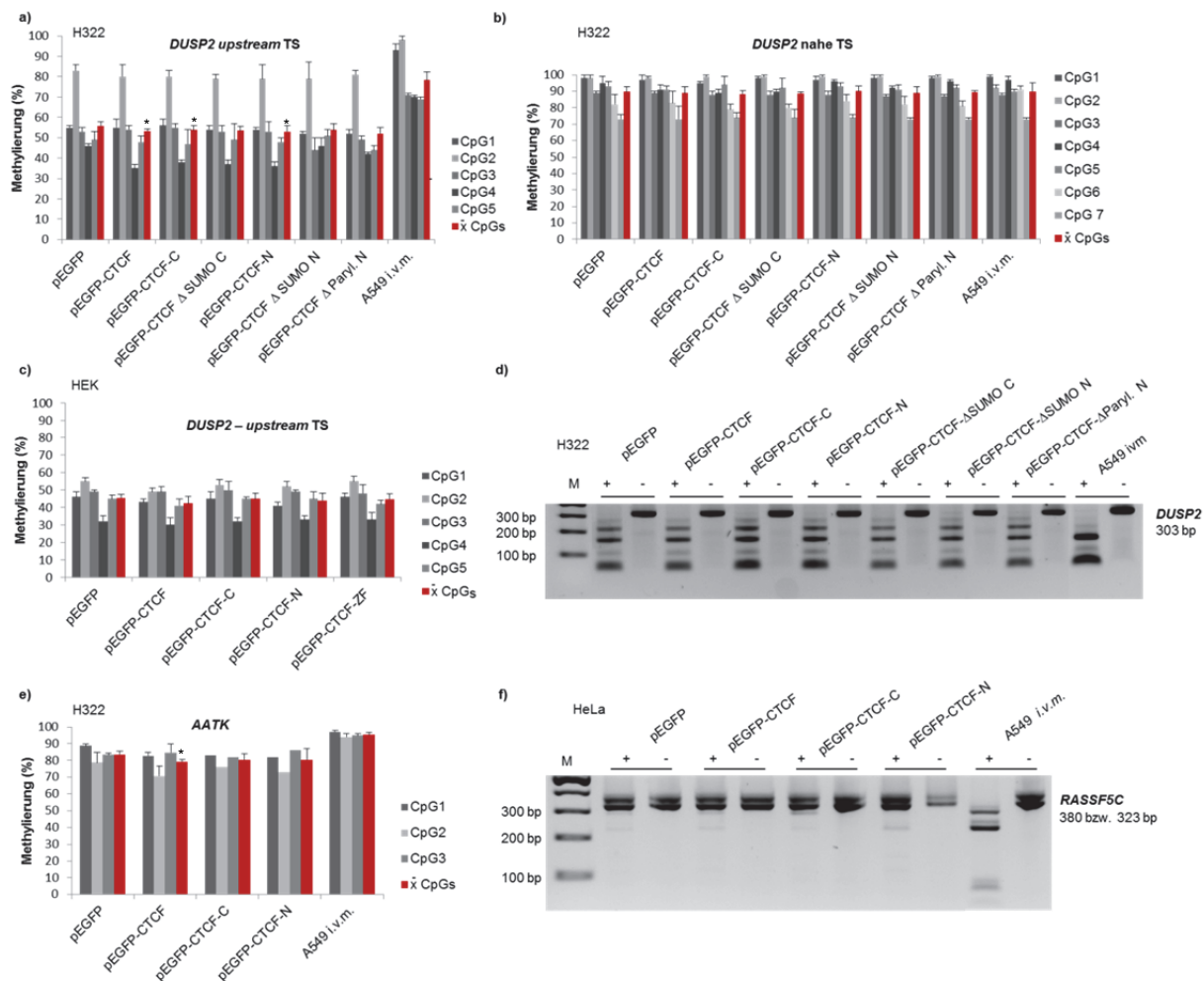


Abbildung 4-14: Einfluss transienter Überexpression von full length CTCF, einzelner CTCF-Domänen sowie von CTCF-Modifikationen auf die Promotor-Methylierung von *DUSP2*, *AATK* und *RASSF5C*. Zelllinien mit methylierter *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C*-Promotorregion wurden mit chCTCF-Konstrukten, die nur einzelne chCTCF-Domänen enthalten (pEGFP-CTCF-N-, pEGFP-CTCF-C) oder chCTCF-Konstrukten mit mutierten SUMOylierungsstellen (pEGFP-CTCF-ΔSUMO C, pEGFP-CTCF-ΔSUMO N) oder deletierter PARYlierungsstelle (pEGFP-CTCF-ΔPARYL N) sowie full length CTCF und einer Leervektorkontrolle transient über 48 h transfiziert. Im Anschluss an die DNA-Isolation und Bisulfitbehandlung folgte die Amplifikation mit Gen-spezifischen Primerpaaren (für Pyrosequenzierung biotinylierter reverser Primer) und die Methylierungsanalyse mittels COBRA und Pyrosequenzierung. Für die COBRA (d,f) wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym *TaqI* verdaut. Neben dem Restriktionsansatz (+) wurde ein mock-Ansatz (-) ohne Enzym mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte zusammen mit einem 100 bp-Marker (M) im 2%-igen Agarosegel. Die quantitativen Methylierungsdaten (a-c,e) setzen sich aus den Methylierungswerten der einzelnen, analysierten CpGs sowie dem Durchschnittswert aller in einer Region untersuchten CpG-Dinukleotide zusammen. Mit Ausnahme der *AATK*-Promotor-methylierungsanalyse nach Überexpression des CTCF N- bzw. C- Terminus wurden für die Auswertung die Daten aus drei unabhängigen Experimenten herangezogen. Als Positivkontrolle wurde in beiden Experimenten *in vitro* methylierte (i.v.m.), Bisulfit-behandelte A549-DNA verwendet. (*: signifikant; berechnet mit GraphPad *t test calculator*).

Innerhalb des *AATK*-Promotors wurden drei CpGs hinsichtlich Methylierungsveränderungen nach Überexpression der CTCF-Konstrukte betrachtet. Die durch CTCF herbeigeführten Effekte sind insgesamt ähnlich schwach wie bei *DUSP2*. Nach full length CTCF Überexpression ist eine geringe, aber signifikante Abnahme der durchschnittlichen Methylierung aller drei CpGs von 84% auf 79% ($p=0,048$) verglichen zur Leervektorkontrolle erkennbar (Abb. 4-14 e), wobei die Methylierungsabnahme an CpG1 6% und an CpG2, das in der CTCF-Bindestelle liegt, 8% beträgt, während CpG3 nicht demethyliert wird. Ähnliche schwach demethylierende Effekte sind auch nach Überexpression des C und N-Terminus erkennbar.

In einem weiteren Experiment wurde analysiert, ob die Kombination aus einer Behandlung mit der demethylierenden Substanz Aza und CTCF-Überexpression zu einem synergistischen Effekt führt, d.h. ob die Demethylierung am *AATK*- und *DUSP2*-Promotor verstärkt wird. Dazu wurden H322-Zellen, bei denen sowohl der *AATK*- als auch der *DUSP2*-Promotor stark bzw. vollständig methyliert vorliegt, über vier Tage mit Aza behandelt und zusätzlich nach zwei Tagen mit *full length* chCTCF transfiziert. Nach insgesamt vier Tagen folgte die DNA-Isolation und Bisulfitbehandlung. Der Methylierungsstatus, der im Amplifikat des *DUSP2*-Promotors *upstream* des Transkriptionsstarts gelegenen Region sowie der von *AATK* wurden mittels Pyrosequenzierung bestimmt. Die demethylierende Wirkung von Aza konnte erneut erfasst werden (Abb. 4-15). Eine Änderung des durchschnittlichen Methylierungsgrades aller analysierten CpGs einer Region nach zusätzlicher CTCF-Überexpression liegt aber weder für *DUSP2* noch für *AATK* vor (Abb. 4-15). Neben der DNA wurde in diesem Experiment auch die RNA isoliert, um Expressionsanalysen durchzuführen. Dies war jedoch nicht möglich, da die Kombination aus CTCF-Überexpression und Aza-Behandlung zur Degradation der RNA führte, wohingegen die Qualität der DNA einwandfrei war.

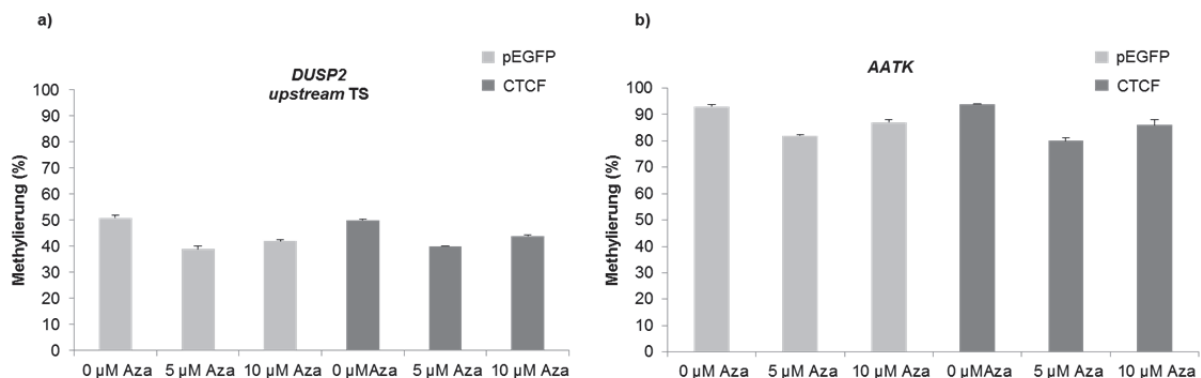


Abbildung 4-15: Unveränderte *DUSP2*- und *AATK*-Promotormethylierung nach *full length* CTCF-Überexpression in Kombination mit Aza-Behandlung. H322-Zellen wurden über vier Tage mit unterschiedlichen 5-Aza-dC- (Aza) Konzentrationen (0, 5, 10 μ M) behandelt, wobei nach zwei Tagen zusätzlich mit *full length* chCTCF bzw. dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurde. Im Anschluss wurde die DNA isoliert, Bisulfit-behandelt mit Gen-spezifischen Primern (biotinylierter Reverse-Primer) amplifiziert und Pyro-sequenziert. Der Methylierungsstatus stellt den prozentualen Durchschnittswert der Methylierungsgrade der analysierten CpG-Dinucleotide in einer Region dar (*AATK*: 3 CpGs; *DUSP2*: 5 CpGs). Gemittelt wurden die Werte aus drei Pyrosequenzierungen. Für *DUSP2* wurde die im Amplifikat *upstream* des Transkriptionsstart (TS) gelegene Region untersucht.

Zusammenfassend betrachtet konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *full length* CTCF und einzelner CTCF-Domänen schwach demethylierende Effekte am *AATK*-Promotor sowie einer der beiden analysierten Regionen im *DUSP2*-Promotor hervorruft. Mutationen in den SUMOylierungsstellen und Deletion der PARYlierungsstelle von CTCF bedingen keine Unterschiede verglichen zu *full length* CTCF oder der einzelnen Domänen, wobei dies nur für *DUSP2* analysiert wurde. Für *RASSF5C* konnte kein demethylierender Einfluss erfasst werden. Allerdings beschränkte sich die Analyse diesbezüglich auf die COBRA-Technik, die schwache Veränderungen nicht detektieren kann. CTCF und Aza-Behandlung führen des Weiteren nicht zu einer synergistischen, verstärkend demethylierenden Wirkung auf den *AATK*- oder *DUSP2*-Promotor.

4.4.4 Auswirkung der Depletion von CTCF auf die RNA-Expression von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* sowie auf die *DUSP2*-Promotormethylierung

In den bereits beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine CTCF-Überexpression zu gesteigerter RNA-Expression von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* sowie zu einer schwachen Demethylierung des *AATK*- und des *DUSP2*-Promotors führt. Diese Beobachtung führt im Umkehrschluss zu der Hypothese, dass eine Depletion von CTCF einen gegenteiligen Effekt hat, d.h. die Expression von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* reduziert wird und die Promotormethylierung wieder zunimmt. Um dies zu überprüfen, wurden Zelllinien mit schwach bzw. partiell methyliertem *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*-Promotorbereich an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Mix aus fünf unterschiedlichen siRNAs gegen hCTCF bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 96 h folgte die Extraktion von DNA, RNA und Protein. Der Nachweis des *Knockdowns* wurde mittels qRT-PCR auf RNA-Expressionsebene und durch WesternBlot auf Proteinebene erbracht. Beispielfhaft ist dies für HEK-Zellen in Abbildung 4-16 a bzw. e dargestellt. Der *Knockdown* von hCTCF in HEK-Zellen resultiert in einer deutlichen Abnahme des CTCF Proteinlevels (Abb. 4-16e) und einer fünffachen Abnahme der CTCF-RNA-Expression (Abb. 4-16a). Die *RASSF5C*-RNA-Expression wird um die Hälfte reduziert; die von *AATK* nimmt um etwa das Zweieinhalbfache ab und die *DUSP2*-RNA-Expression wird um den Faktor 3 vermindert (Abb. 4-16a). In HeLa- und HTB171-Zellen ist die Abnahme der *DUSP2*-Expression nach CTCF-*Knockdown* mit einer Reduktion von etwa 40-45% weniger stark ausgeprägt (Abb. 4-16b). Neben der Auswirkung des CTCF-*Knockdowns* auf die RNA-Expressionslevel der Kandidatengene, wurde auf DNA-Ebene die Änderung der *DUSP2*-Promotormethylierung mittels Pyrosequenzierung erfasst. Hierbei wurde die *upstream* des Transkriptionsstarts gelegene Region betrachtet, da dort eine schwache Demethylierung nach CTCF-Überexpression zu beobachten ist. Eine Zunahme der Methylierung liegt in HeLa und HTB171-Zellen ausschließlich an dem die CTCF-Bindestelle beinhaltenden CpG2 vor, wobei der prozentuale Unterschied der Methylierung an diesem CpG 4% bis 5% beträgt (Abb. 4-16c, d), aber nicht signifikant ist. Alle analysierten CpG-Dinukleotide zusammen betrachtet, weisen nur einen Unterschied von unter einem Prozent auf.

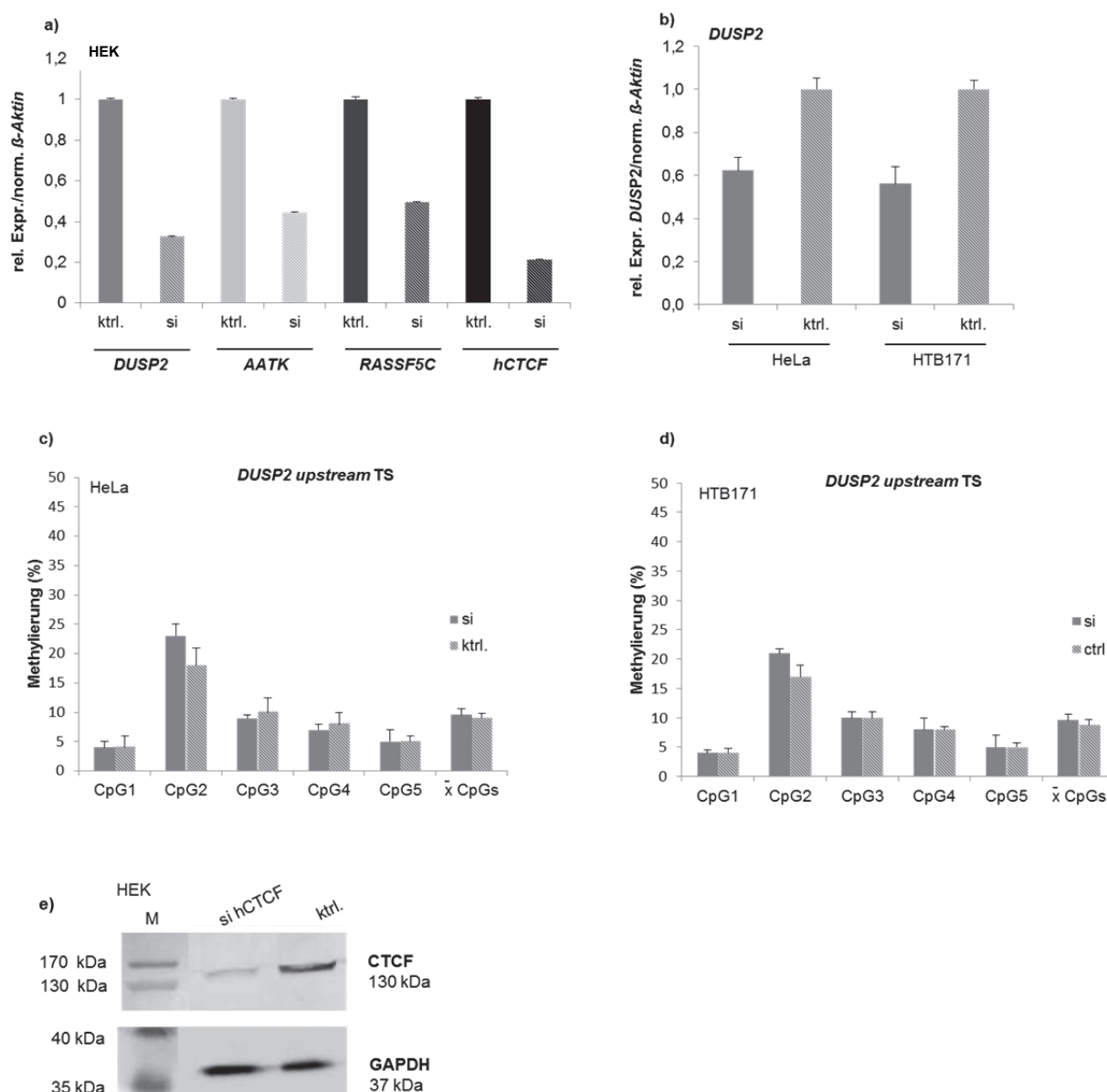


Abbildung 4-16: Änderung der RNA-Expressionslevel von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* sowie der *DUSP2*-Promotor-methylierung nach CTCF-Knockdown. HeLa-, HEK- und HTB171-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Mix aus fünf unterschiedlichen siRNAs gegen hCTCF bzw. einer Kontroll-siRNA (ktrl.) transfiziert. Nach 96 h folgte die Extraktion von DNA, RNA und Protein. Der Nachweis des Knockdowns wurde auf RNA-Expressionsebene sowie Proteinebene erbracht. In e ist beispielhaft für HEK-Zellen die Abnahme des CTCF-Proteins, detektiert mittels WesternBlot, dargestellt. Für die Expressionsanalysen (a,b) wurde die RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und im Anschluss mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren mittels qPCR amplifiziert. Die Gen-spezifischen Expressionen wurden auf β -Aktin normalisiert und die Expression der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Für die *DUSP2*-Promotor-methylierungsanalysen (c,d) wurde die isolierte DNA Bisulfit-behandelt mit Gen-spezifischen Primern (biotinylierter Reverse-Primer) amplifiziert und Pyro-sequenziert. Die *DUSP2*-Promotormethylierung wurde quantitativ in der Region *upstream* des Transkriptionsstarts (TS) erfasst. Es sind sowohl die prozentualen Methylierungswerte der einzelnen untersuchten CpG-Dinukleotide, als auch die durchschnittliche Methylierung aller fünf in dieser Region befindlichen CpG-Dinukleotide dargestellt. Für alle Auswertungen wurden die Ergebnisse aus zwei CTCF-Knockdowns je Zelllinie berücksichtigt. Die qRT-PCR wurde für jedes Gen dreimal wiederholt, wobei jeweils Triplikate bestimmt wurden. Die Pyrosequenzierung wurde ebenfalls dreifach durchgeführt und die Werte gemittelt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Depletion von CTCF zu reduzierter *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*-RNA-Expression in Zellen mit schwach oder partiell methylierter Promotorregion führt. Eine Änderung der *DUSP2*-Promotor-Methylierung wird durch die Depletion nicht herbeigeführt bzw. eine schwache, nicht signifikante Methylierungszunahme beschränkt sich auf ein einziges CpG-Dinukleotid, welches innerhalb der CTCF-Bindestelle liegt.

4.4.5 Einfluss von CTCF in stabil induzierbaren TREx293-chCTCF-Zellklonen auf die AATK- und DUSP2-RNA-Expression

In den vorangegangenen Experimenten wurde der Einfluss von CTCF auf die Kandidatengene nach transientser chCTCF-Transfektion erfasst. Um die Heterogenität in der Zellkultur vor allem hinsichtlich der Methylierung einzugrenzen und um CTCF in einem robusten, stabilen System gezielt ein- und ausschalten zu können, wurden mit Hilfe des T-REx-Systems Zellklone hergestellt, die tetrazyklinabhängig chCTCF exprimieren. Dazu wurden TREx293-Zellen, die stabil den Tet-Repressor exprimieren, mit dem Expressionsvektor pcDNA4TO-chCTCF transfiziert und über Zeocin selektioniert. Die gewachsenen Zellklone wurden isoliert und einzeln kultiviert. Die zur Induktion von chCTCF nötige Tetrazyklinmenge wurde im Vorfeld unter Verwendung eines lacZ-Kontrollplasmids mittels β -Gal-Assay bestimmt. Im Anschluss wurden die Klone auf chCTCF-Expression getestet. Die Expression wurde sowohl auf Proteinebene über WesternBlot als auch auf RNA-Ebene mittels qualitativer und quantitativer RT-PCR erfasst. Die Klone mit der höchsten Induzierbarkeit wurden ausgewählt und für Folgeexperimente genutzt. Weiterhin wurde der Zeitraum ermittelt, bei dem die chCTCF-Expression nach Tetrazyklininduktion am Stärksten ist. Beispielhaft sind die CTCF-Expressionsanalysen für zwei der ausgewählten Klone (Klon A2 und Klon A3) in Abbildung 4-17a und c sowie der Nachweis der CTCF-Induktion auf Proteinebene (d) für Klon A3 dargestellt.

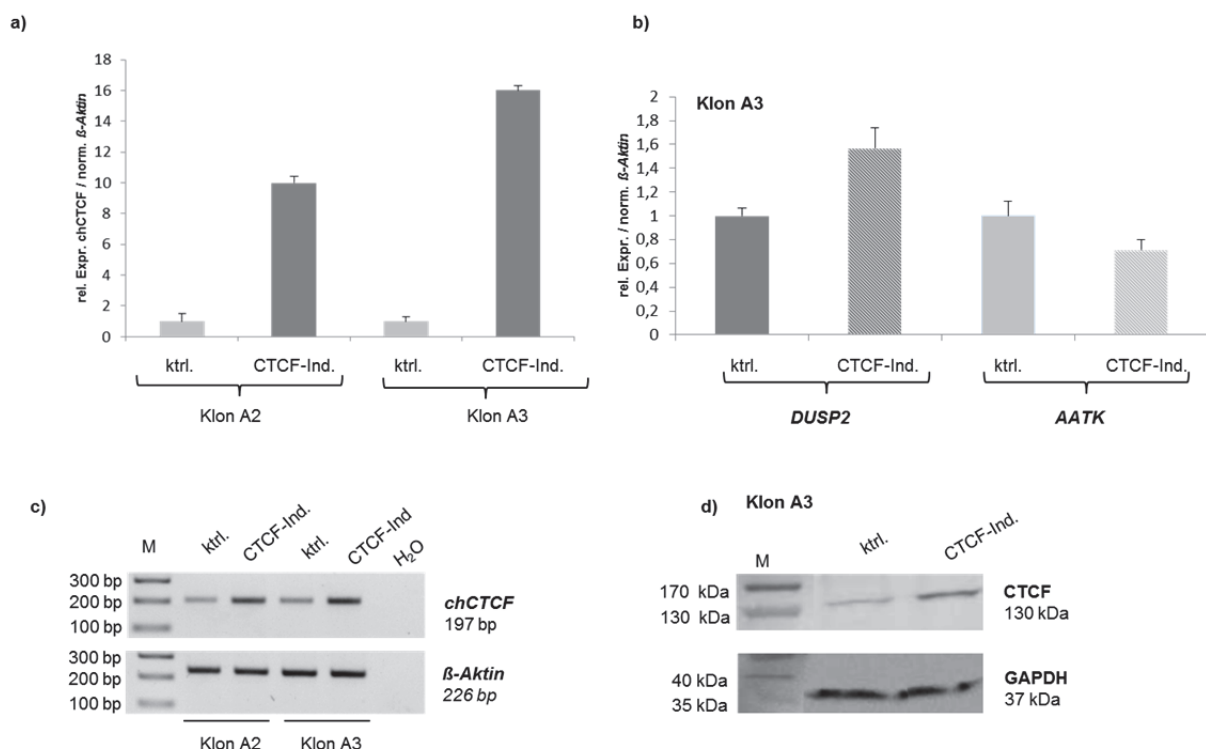


Abbildung 4-17: CTCF-Induktion stabiler induzierbarer Zellklone mittels Tetrazyklin und Auswirkung auf die AATK- und DUSP2-RNA-Expression. TREx293-Zellen, die stabil den Tet-Repressor exprimieren, wurden mit dem Expressionsvektor pcDNA4TO-chCTCF transfiziert und über Zeocin selektioniert. Die chCTCF-Expression wurde durch Zugabe von Tetrazyklin (5 μ l/ml) über zwei Tage ermöglicht und mittels WesternBlot (d) auf Proteinebene und qualitativer (c) sowie quantitativer (a) RT-PCR auf RNA-Ebene nachgewiesen. Der Einfluss der CTCF-Induktion (CTCF-Ind.) auf die RNA-Expression von AATK und DUSP2 (b) wurde mittels quantitativer RT-PCR erfasst. Bei den quantitativen Expressionsanalysen wurde die spezifische Genexpression auf β -Aktin normalisiert und die Werte der uninduzierten Kontrolle (ktrl.) gleich eins gesetzt. In die Auswertung der quantitativen RT-PCRs wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten einbezogen, wobei für jede qRT-PCR Triplikate bestimmt wurden.

Klon A3 weist nach Tetrazyklininduktion über 48 Stunden eine 16-fache Steigerung der chCTCF-RNA-Expression (Abb. 4-17a) sowie ein gesteigertes CTCF-Proteinlevel (Abb. 4-17d) auf. Bei Klon A2 beschränkt sich die Erhöhung des chCTCF RNA-Expressionslevels auf das 10-fache (Abb. 4-17a). Der Einfluss der CTCF-Induktion auf die RNA-Expression von *AATK* und *DUSP2* wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. *RASSF5C* wurde in diese Analyse nicht mit einbezogen, da im Vorfeld gezeigt werden konnte, dass der *RASSF5C*-Promotor in HEK-Zellen aktiv vorliegt (siehe Punkt 4.1.1.3) und damit keine Reexpression nach CTCF-Induktion zu erwarten wäre. Für Klon A3 ist nach tetrazyklininduzierter CTCF-Expression eine Steigerung der *DUSP2*-RNA-Expression um den Faktor 1,5 nachweisbar, während die *AATK*-RNA-Expression leicht absinkt (Abb. 4-17b). Ähnliche Effekte, jedoch etwas schwächer ausgeprägt, können für Klon A2 erfasst werden und sind dem Anhang zu entnehmen.

Insgesamt betrachtet, war es möglich, eine stabile Zelllinie herzustellen, die chCTCF tetrazyklinabhängig exprimiert. Weiterhin konnte die nach transients chCTCF-Überexpression beobachtete *DUSP2*-RNA-Reexpression in H322- und HEK-Zellen auch nach chCTCF-Induktion in den stabilen Klonen nachgewiesen und damit verifiziert werden. Eine *AATK*-RNA-Reexpression wurde, wie auch in wildtyp HEK-Zellen, nicht beobachtet.

4.4.6 Analyse der CTCF-Bindung an den *AATK*-, *DUSP2*- und *RASSF5C*-Promotor

In der Literatur sind Daten zu finden, die darauf hinweisen, dass CTCF nur an unmethylierte Konsensussequenzen bindet (Fillipova, 2008). Allerdings gibt es auch Berichte, denen zu Folge CTCF in der Lage ist, an CpG-arme, methylierte Regionen zu binden (Stadler *et al.*, 2011). Um die CTCF-Bindung an die Promotoren von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* zu erfassen, wurden vorhandene ChIP-Seq-Daten (UCSC *Genome Browser*) in Zusammenhang mit den zuvor produzierten Methylierungsdaten betrachtet sowie CTCF-Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) in Zelllinien mit unterschiedlichem Methylierungsstatus durchgeführt.

Für *AATK* zeigen die ChIP-Seq-Daten, dass CTCF im *AATK*-Promotorbereich nicht an die methylierte putative CTCF-Bindestelle in HeLa- und MCF7-Zellen bindet. Eine schwache Bindung hingegen findet sich in A549-Zellen, die einen partiell methylierten (47%) *AATK*-Promotor besitzen (Abb. 4-18a). In HepG2-Zellen ist die CTCF-Bindung an der betrachteten CTCF-Bindestelle verstärkt, allerdings wurde der Methylierungsstatus nicht erfasst. In HEK-Zellen wurde mittels ChIP keine CTCF-Bindung an der Promotorbindestelle erfasst, wobei auch die Positivkontrolle nur ein sehr schwaches Signal für CTCF aufweist (Abb. 4-18b). Den ChIP-Seq-Daten zufolge liegt in HEK-Zellen an der Promotorbindestelle ebenfalls keine Bindung vor (Abb. 4-18a).

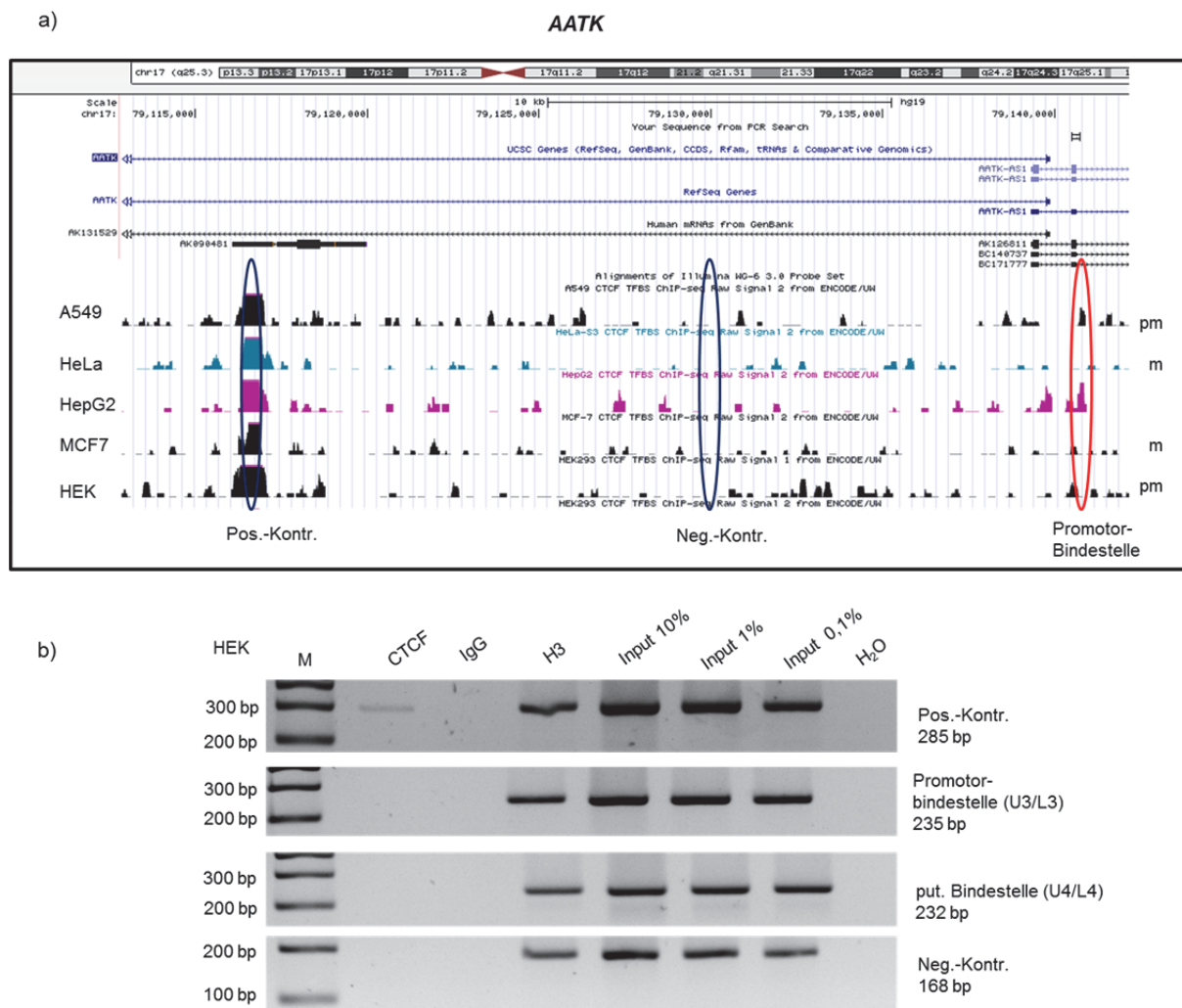


Abbildung 4-18: Methylierungsabhängige Bindung von CTCF an den AATK-Promotor. a) Öffentlich zugängliche CTCF-ChIP-Seq-Daten (UCSC-Genome-Browser) mit Hervorhebung (ovale Markierung) der mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) auf CTCF-Bindung untersuchten Regionen des AATK-Gens (Positivkontrolle (Pos.-Kontr.), Negativkontrolle (Neg.-Kontr.) und Promotorbindestelle). Am rechten Bildrand ist der zuvor ermittelte AATK-Methylierungsstatus in der jeweiligen Zelllinie angegeben (pm: partiell methyliert, m: methyliert). b) CTCF-ChIP mit HEK-Zellen. Das Chromatin wurde jeweils mit einem CTCF- (Millipore), IgG- (Negativkontrolle) und H3-Antikörper (Positivkontrolle) präzipitiert sowie eine unbehandelte Inputkontrolle mitgeführt. Die DNA wurde im Anschluss mit Gen-spezifischen Primern für die in a) angegebenen AATK-Regionen amplifiziert, wobei für die Promotorbindestelle zwei unterschiedliche Primerpaare (U3/L3 und U4/L4) verwendet wurden. Der Nachweis der CTCF-Bindung wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht.

Zugängliche ChIP-Seq-Daten im UCSC *Genome Browser* zeigen an, dass in HeLa-Zellen mit unmethyliertem *DUSP2*-Promotor eine Bindung von CTCF an die betrachtete putative Bindestelle innerhalb des *DUSP2*-Promotors vorliegt, während diese in MCF7- und HEK-Zellen mit partiell methyliertem *DUSP2*-Promotor nicht zu beobachten ist (Abb. 4-19a). Durchgeführte ChIP-Analysen zeigen, dass CTCF an den unmethylierten *DUSP2*-Promotor in HTB171-Zellen bindet, nicht aber an den schwach methylierten *DUSP2*-Promotor in MeWo-Zellen (Abb. 4-19b). H322, die einen stark methylierten *DUSP2*-Promotor besitzen, weisen eine CTCF-Bindung auf, jedoch ist auch in der Negativkontrolle eine Bande erkennbar, die über dem IgG liegt. Vergleicht man die Verhältnisse zwischen CTCF und IgG-Signal der Negativkontrolle und der Promotorbindestelle, bemerkt man, dass diese in etwa gleich sind, d.h. die Bindung ist wahrscheinlich unspezifisch. Auch bei mehrmaligen Wiederholungen des Experimentes konnte keine spezifische Bindung nachgewiesen werden, da die Negativkontrolle immer ein Signal aufwies. Öffentlich zugängliche ChIP-Seq-Daten für diese Zelllinie sind leider nicht verfügbar.

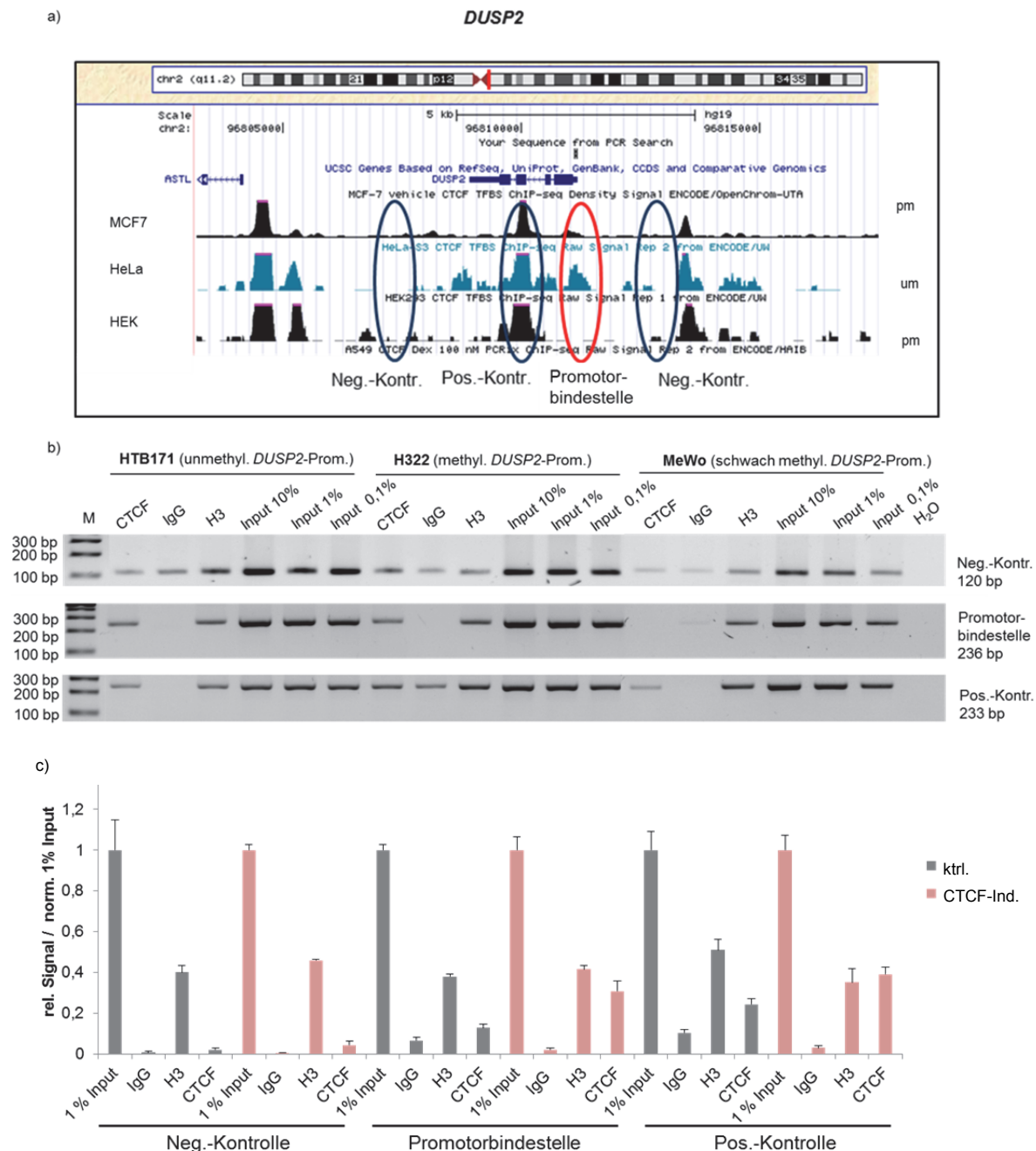


Abbildung 4-19: Methylierungsabhängige und durch CTCF-Induktion verstärkte Bindung von CTCF an den *DUSP2*-Promotor. a) Öffentlich zugängliche CTCF-ChIP-Seq-Daten (UCSC-Genome-Browser) mit Hervorhebung (ovale Markierung) der mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) auf CTCF-Bindung untersuchten Regionen des *DUSP2*-Gens (Positivkontrolle (Pos.-Kontr.), Negativkontrollen (Neg.-Kontr.) und Promotorbindestelle). Am rechten Bildrand ist der zuvor ermittelte *DUSP2*-Methylierungsstatus in der jeweiligen Zelllinie angegeben (um: unmethyliert, pm: partiell methyliert, m: methyliert). b) CTCF-ChIP mit HTB171-, H322- und MeWo-Zellen. Das Chromatin wurde jeweils mit einem CTCF- (Millipore), IgG- (Negativkontrolle) und H3-Antikörper (Positivkontrolle) präzipitiert sowie eine unbehandelte Inputkontrolle mitgeführt. Die DNA wurde im Anschluss mit Gen-spezifischen Primern für die in a) angegebenen *DUSP2*-Regionen amplifiziert, wobei die *downstream* der Promotorbindestelle gelegene Negativkontrollregion betrachtet wurde. Der Nachweis der CTCF-Bindung wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht. c) CTCF-ChIP mit TReX293-chCTCF-Zellen (Klon A3) nach CTCF-Induktion. Die CTCF-Expression wurde durch Zugabe von 5 µl/ml Tetrazyklin induziert; zusätzlich wurde eine uninduzierte Kontrolle mitgeführt. Nach 48 h wurde das Chromatin präpariert und mit Antikörpern wie in b) präzipitiert, wobei ein anderer CTCF-Antikörper verwendet wurde (N2.2). Die DNA wurde mit Gen-spezifischen Primern für die angegebenen Regionen (a) amplifiziert, wobei als Negativkontrolle die *upstream* der Promotorbindestelle gelegene Region verwendet wurde. Die CTCF-Bindung wurde quantitativ mittels qPCR erfasst und die Werte (jeweils Triplikate aus zwei unabhängigen Experimenten) für die präzipitierten Proben auf den 1% Input normalisiert, der gleich 1 gesetzt wurde.

In den induzierbaren TREx293-chCTCF-Zellen wurden CTCF-ChIPs nach CTCF-Induktion mittels Tetrazyklin durchgeführt, um zu analysieren, ob dadurch die CTCF-Bindung am *DUSP2*-Promotor gesteigert werden kann. Die Bindung wurde mit Hilfe quantitativer PCR erfasst, wobei als Negativkontrolle die weiter von der Promotorbindestelle entfernte Region verwendet wurde. Die Bindung von CTCF an die putative Bindestelle innerhalb des *DUSP2*-Promotors nimmt nach CTCF-Induktion um das 2,3-fache zu (Abb. 4-19c). An der Bindestelle, die als Positivkontrolle verwendet wurde, wird die CTCF-Bindung nach CTCF-Induktion um das 1,6-fache gesteigert.

Die CTCF-Bindung am *RASSF5C*-Promotor ist den ChIP-Seq-Daten des UCSC *Genome Browsers* zufolge methylierungsabhängig, d.h. sowohl in MCF7- als auch in HEK-Zellen mit unmethyliertem *RASSF5C*-Promotor findet sich eine CTCF-Bindung, während diese in HeLa-Zellen nicht vorhanden ist (Abb. 4-20a).

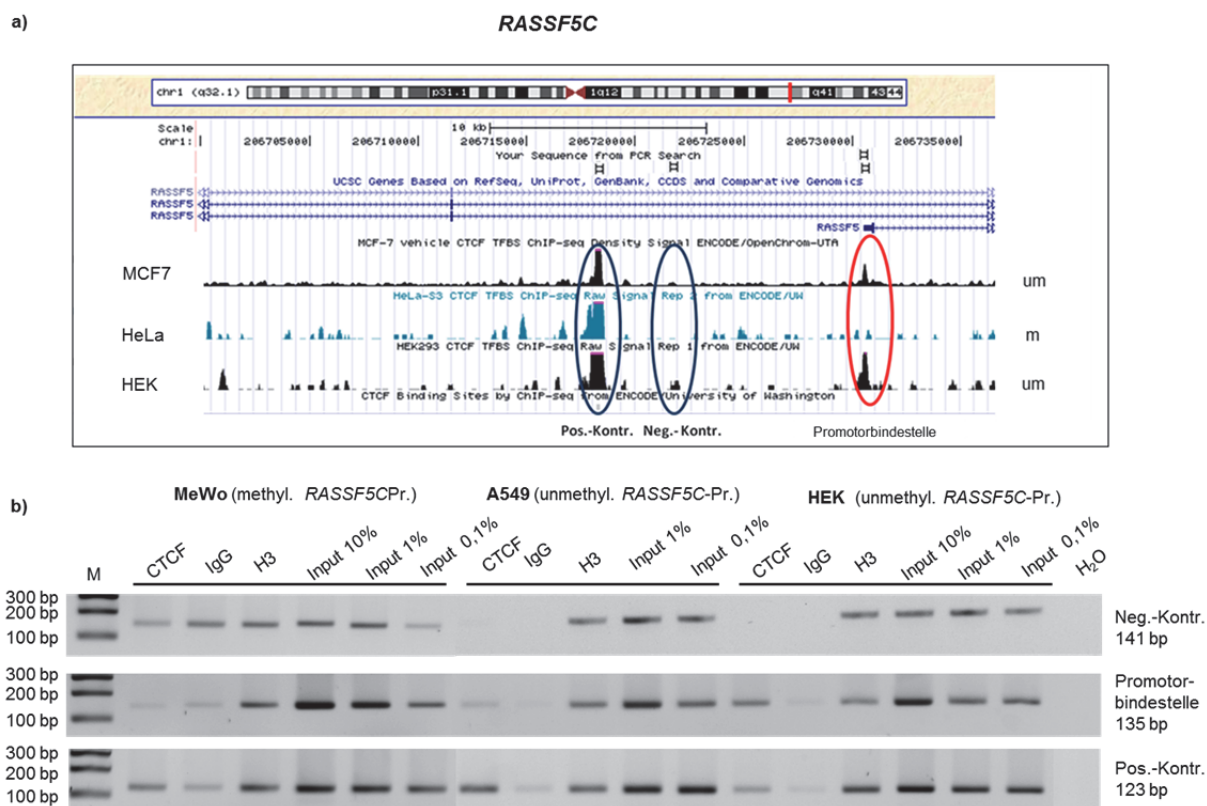


Abbildung 4-20: Methylierungsabhängige Bindung von CTCF an den *RASSF5C*-Promotor. a) Öffentlich zugängliche CTCF-ChIP-Seq-Daten (UCSC-Genome-Browser) mit Hervorhebung (ovale Markierung) der mittels Chromatin-Immuno-präzipitation (ChIP) auf CTCF-Bindung untersuchten Regionen des *RASSF5C*-Gens (Positivkontrolle (Pos.-Kontr.), Negativkontrolle (Neg.-Kontr.) und Promotorbindestelle). Am rechten Bildrand ist der zuvor ermittelte *RASSF5C*-Methylierungsstatus in der jeweiligen Zelllinie angegeben (um: unmethyliert, m: methyliert). b) CTCF-ChIP mit MeWo-, A549- und HEK-Zellen. Das Chromatin wurde jeweils mit einem CTCF- (Millipore), IgG- (Negativkontrolle) und H3-Antikörper (Positivkontrolle) präzipitiert sowie eine unbehandelte Inputkontrolle mitgeführt. Die DNA wurde im Anschluss mit Gen-spezifischen Primern für die in a) angegebenen *RASSF5C*-Regionen amplifiziert. Der Nachweis der CTCF-Bindung wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht.

Auch die durchgeführten CTCF-ChIPs bekräftigen dies. In HEK- und in A549-Zellen mit unmethyliertem *DUSP2*-Promotor ist eine CTCF-Bindung an der analysierten Promotorbindestelle nachweisbar, wobei die Bindung in HEK-Zellen deutlich stärker ist als in A549-Zellen (Abb. 4-20b). Bei den, einen methylierten *RASSF5C*-Promotor aufweisenden, MeWo-Zellen liegt keine CTCF-Bindung vor.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit nachgewiesen werden, dass CTCF methylierungsabhängig bindet, wobei eine Bindung auch an partiell methylierten Regionen möglich ist, wie anhand der ChIP-Seq-Daten für *AATK* in A549-Zellen gezeigt. Des Weiteren führt eine zusätzliche CTCF-Induktion zur verstärkten CTCF-Bindung an den in TREx293-chCTCF-Zellen partiell methylierten *DUSP2*-Promotor. CTCF wird somit durch die Methylierung nicht geblockt.

4.4.7 Analyse des Einflusses von CTCF auf den *DUSP2*-Promotor *in vitro*

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss von CTCF auf den *DUSP2*-Promotor mittels Luciferaseassays analysiert. Für diese Analyse musste der *DUSP2*-Promotor zunächst in einen *Renilla*-Luciferasevektor (pRLnull) kloniert werden. Der Ablauf dieser Promotorklonierung ist in Abbildung 4-21 dargestellt. Zunächst wurde eine knapp 500 bp große *DUSP2*-Promotorregion mittels PCR unter Verwendung von Primern mit *Bgl*II- und *Bam*HI-Überhängen amplifiziert, wobei DNA aus humanen Fibroblasten als Matrize diente. Das erhaltene Produkt wurde per Gelextraktion isoliert und mit dem offenen Zwischenvektor pGEM-T ligiert. Über Blau-Weiß-Selektion wurden positive Klone identifiziert. Diese Klone wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen und bei korrektem Restriktionsmuster sequenziert. Ein korrekter Klon wurde anschließend präparativ mit *Bam*HI/*Bgl*II geschnitten (Abb. 4-21), das Insert, d.h. der *DUSP2*-Promotor vom Restvektor getrennt, aus dem Gel isoliert und in den mit *Bgl*II linearisierten Fluoreszenzvektor pRLNull ligiert. Gewachsene Klone wurden mit *Bgl*II/*Pst*I testweise restringiert. Klon 10 wurde als richtig identifiziert (Abb. 4-21) und ansequenziert. Die Sequenzüberprüfung (siehe Anhang) ergab, dass dieser Klon den *DUSP2*-Promotor in korrekter Orientierung trägt und für weitere Experimente verwendet werden konnte. Nach der Klonierung wurde der den *DUSP2*-Promotor enthaltende Vektor (pRLNull-*DUSP2*-Promotor) *in vitro* methyliert und diese *in vitro* Methylierung über Restriktion mit den Isoschizomeren *Hpa*II/*Msp*I überprüft. Beide Enzyme schneiden die gleiche Sequenz, *Hpa*II ist jedoch methylierungssensitiv und spaltet keine methylierte DNA. Wie in Abbildung 4-21 dargestellt, konnte das Konstrukt *in vitro* methyliert werden. Des Weiteren wurden die in der *DUSP2*-Promotorregion gelegenen CTCF-Bindestellen durch zwei aufeinanderfolgende Mutagenese-PCRs deletiert und auch diese Konstrukte im Luciferaseassay eingesetzt. Die Sequenzierungen der erfolgreichen Deletionen sind ebenfalls dem Anhang zu entnehmen.

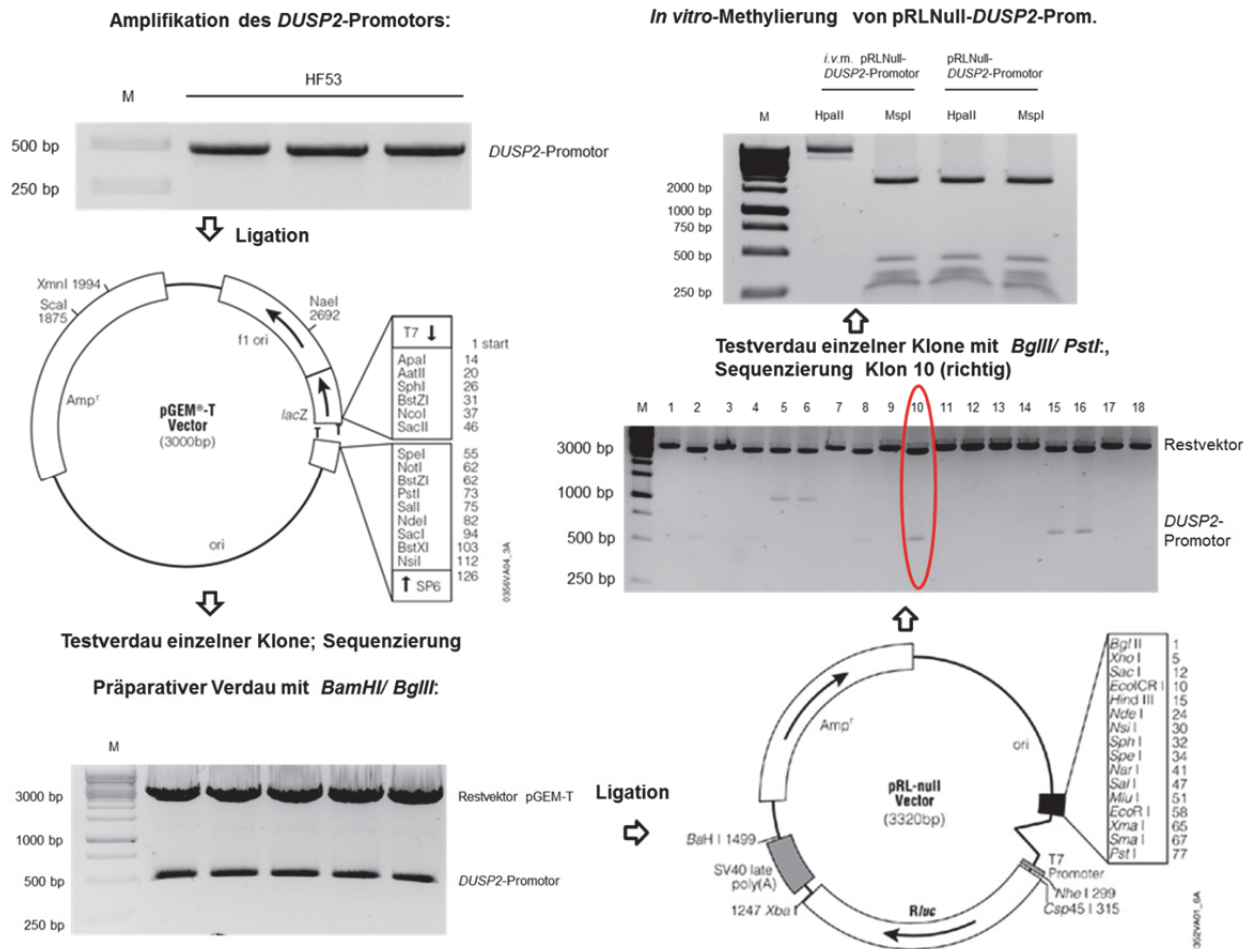


Abbildung 4-21: Ablauf der *DUSP2*-Promotorklonierung. Die *DUSP2*-Promotorregion humaner Fibroblasten-DNA (HF-53) wurde mit spezifischen Primern (5' *Bgl*II- und *Bam*HI-Überhang) amplifiziert, das Produkt per Gelextraktion isoliert, in pGEM-T subkloniert und die gewachsenen Klone blau-weiß selektioniert. Positive Klone wurden mit *Bam*HI/*Bgl*II testverdaut und bei korrektem Restriktionsmuster sequenziert. Es folgte ein präparativer Verdau, um den *DUSP2*-Promotor vom Vektor zu trennen. Isoliert wurde der *DUSP2*-Promotor erneut durch Gelextraktion. Dann erfolgte die Ligation in den Luciferasevektor pRLNull über *Bam*HI/*Bgl*II. Gewachsene Klone wurden mit *Bgl*III/*Pst*I testverdaut und positive Klone (u.a. Klon 10) sequenziert. Der korrekte Klon 10 wurde anschließend *in vitro* methyliert und diese Methylierung über einen Verdau mit *Hpa*II/*Msp*I überprüft. Die Auftrennung der Vektoren und des PCR-Produktes erfolgte im 1%-igen Agarosegel zusammen mit einem 1kb- Marker (M).

Für die Analyse des Einflusses von CTCF auf den *DUSP2*-Promotor wurden HEK-Zellen mit dem pRLNull-*DUSP2*-Promotorkonstrukt, der *in vitro* methylierten Variante sowie der mit fehlenden CTCF-Bindestellen zusammen mit pEGFP-chCTCF bzw. der zugehörigen Leervektorkontrolle transient transfiziert. Zudem wurde der die *Firefly*-Luciferase kodierende Vektor pGL3.1 bei allen Ansätzen co-transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Zelllyse und das Pelletieren der Zelltrümmer. Der Überstand wurde für die Luciferasemessungen (*Firefly* und *Renilla*) verwendet, wobei die für *Renilla*-Luciferase gemessenen Werte durch die für *Firefly*-Luciferase dividiert wurden, um mögliche Unterschiede zwischen den Experimenten zu normalisieren.

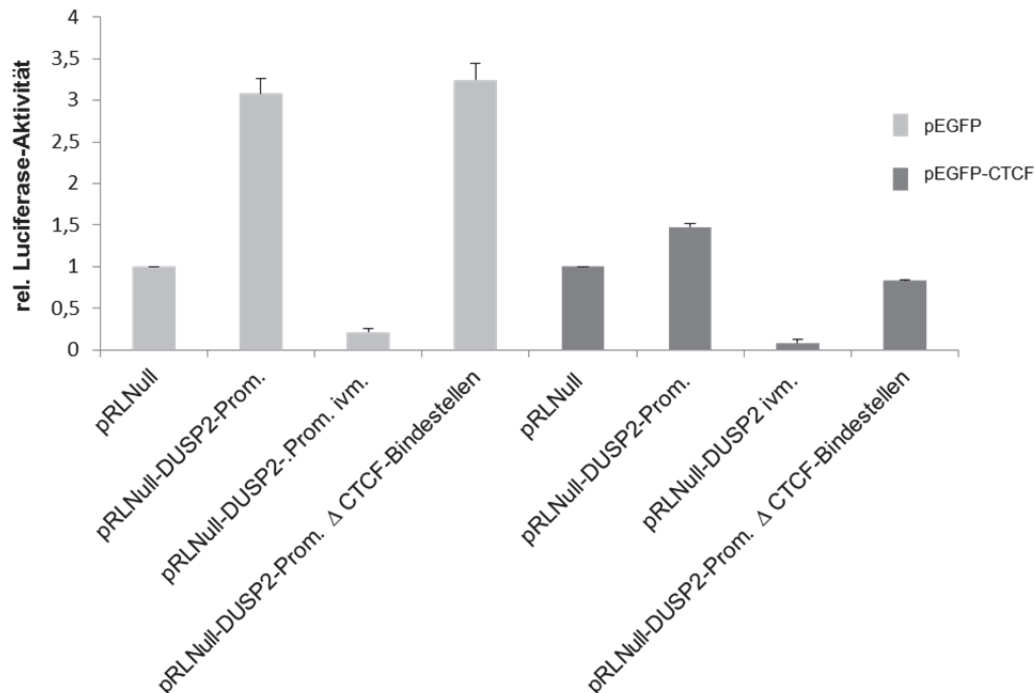


Abbildung 4-22: Einfluss künstlich herbeigeführter Methylierung und transientser CTCF-Überexpression auf den *DUSP2*-Promotor. HEK-Zellen wurden mit einem pRLNull-*DUSP2*-Promotorkonstrukt, einer *in vitro* methylierten Variante sowie einer Variante mit fehlenden CTCF-Bindestellen zusammen mit pEGFP-chCTCF bzw. der zugehörigen Leervektorkontrolle transient transfiziert. pGL3.1 wurde bei allen Ansätzen co-transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Zellyse und das Pelletieren der Zelltrümmer. Der Überstand wurde für die Luciferasemessungen (*Firefly* und *Renilla*) verwendet, wobei die für *Renilla*-Luciferase gemessenen Werte auf die für *Firefly*-Luciferase normalisiert wurden. Die Leervektoren (pRLNull) wurden jeweils gleich 1 gesetzt. Die Werte aus drei unabhängigen Experimenten sind in die Auswertung eingeflossen.

Verglichen mit dem Leervektor pRLNull führt die Transfektion mit dem *DUSP2*-Promotor-Konstrukt zu einer dreifachen Steigerung der Luciferase- und damit der *DUSP2*-Promotoraktivität, während die *in vitro* Methylierung des *DUSP2*-Promotors die Promotoraktivität deutlich verringert (Abb. 4-22). Diese Inhibition der *DUSP2*-Promotor-Aktivität durch Hypermethylierung konnte bereits in HEK-Zellen durch Methylierungs- und Expressionsanalysen nach Aza-Behandlung beobachtet werden (Punkt 4.1.1.2 und 4.2). Die fehlenden CTCF-Bindestellen haben keine Auswirkung auf die *DUSP2*-Promotoraktivität. Die Co-Transfektion mit CTCF führt *in vitro* nicht zu einer gesteigerten *DUSP2*-Promotoraktivität, sondern zu einer Abnahme der Promotoraktivität um die Hälfte. Zudem ist eine Demethylierung durch CTCF, die mit einer Zunahme der *DUSP2*-Promotoraktivität nach Co-Transfektion des *in vitro* methylierten *DUSP2*-Promotorkonstrukts und CTCF einhergehen würde, nicht zu erfassen. Die Promotoraktivität nimmt nach Co-Transfektion von CTCF und dem *in vitro* methylierten *DUSP2*-Promotor sogar noch weiter ab bis hin zur fast vollständigen Inaktivierung. Das Fehlen der beiden CTCF-Bindestellen im *DUSP2*-Promotor resultiert nach CTCF-Co-Transfektion in einer Abnahme der *DUSP2*-Promotoraktivität um 44%, verglichen mit dem intakten *DUSP2*-Promotor (Abb. 4-22). Die Verlängerung der Transfektionszeit auf 48 h brachte ein ähnliches Ergebnis, wobei ebenfalls keine Zunahme der *DUSP2*-Promotoraktivität nach CTCF-Co-Transfektion erfasst werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt betrachtet konnte der *DUSP2*-Promotor erfolgreich in einen Luciferasevektor kloniert und im Luciferaseassay verwendet werden. Eine Hypermethylierung des *DUSP2*-Promotors in HEK-Zellen führt auch *in vitro* zur Inhibition der Promotoraktivität. CTCF steigert die Aktivität des *DUSP2*-Promotors nicht, im Gegenteil, die Aktivität wird verringert.

Des Weiteren vermindert die Deletion der CTCF-Bindestellen die Aktivität des *DUSP2*-Promotors.

4.4.8 Einfluss von CTCF auf die Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor

Die Bedeutung der CpG-Insel-Promotorhypermethylierung von Tumorsuppressorgenen ist ein fundamentales Ereignis in der Karzinogenese. In der Vergangenheit stand die Methylierung am 5-Kohlenstoff des Cytosins in 5'-CpG-3'-Dinukleotiden (5mC) im Mittelpunkt der Forschung. In den letzten Jahren ist auch die 5-Hydroxymethylierung (5hmC) in Verbindung mit Genregulation in Tumoren gebracht worden (Wu & Zhang, 2001; Liu *et al.*, 2013; Haffner *et al.*, 2011).

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CTCF in Zelllinien mit methyliertem *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C*-Promotor zu einer RNA-Reexpression der zuvor genannten Gene führt. Es konnte jedoch nach CTCF-Überexpression nur eine sehr schwache Demethylierung am *AATK*- und *DUSP2*-Promotor detektiert werden. Dies führte zu der Überlegung, dass CTCF eine Änderung der 5hmC-Level im Promotorbereich von Tumorsuppressorgenen bewirken könnte. Da die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse, wie etwa die Pyrosequenzierung oder COBRA im Anschluss an eine konventionelle Bisulfitbehandlung eine Unterscheidung zwischen 5mC und 5hmC nicht ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Techniken im Labor etabliert. Zum Einen das *Tet-assisted bisulfite sequencing* (TAB-Seq; durchgeführt mit 5hmC TAB-Seq Kit, Wisegene) und zum Anderen die *Methylated DNA-Immunoprecipitation* (MeDIP; Protokoll verändert nach Weber & Schübeler, 2007).

Zunächst wurde der Einfluss von CTCF auf die Hydroxymethylierung des *AATK*- und *DUSP2*-Promotors nach transients Transfektion von chCTCF in H322 Zellen mittels TAB-Seq analysiert. *RASSF5C* wurde in die TAB-Seq-Analysen nicht mit einbezogen, da in H322 keine *RASSF5C*-Promotormethylierung vorliegt. Für das TAB-Seq wurden neben den mit mTet1 oxidierten Proben, die die 5hmC-Level anzeigen, *mock*-Ansätze mitgeführt, die nicht oxidiert wurden und damit die Gesamtmethylierung bestehend aus 5mC und 5hmC darstellen. Die Quantifizierung der Methylierungslevel erfolgte mittels Pyrosequenzierung. In der Zelllinie H322 liegt sowohl der *AATK*- als auch der *DUSP2*-Promotor methyliert (5mC+5hmC) vor. Es wurden zwei Regionen innerhalb des *DUSP2*-Promotors untersucht, eine *upstream* des Transkriptionsstarts und eine unmittelbar davor. Die durchschnittliche Gesamtmethylierung aller analysierten CpGs in der *upstream*-Region in untransfizierten H322-Zellen beträgt 56%, wobei die Hydroxymethylierung 26% ausmacht (Abb. 4-23a). In der unmittelbar vor dem Transkriptionsstart gelegenen Region liegt die Gesamtmethylierung aller analysierten CpGs zusammengefasst bei 68%; die Hydroxymethylierung nimmt einen Anteil von 32% ein (Abb. 4-23b). Nach CTCF-Überexpression nimmt die Hydroxymethylierung in beiden untersuchten Regionen deutlich ab (Abb. 4-23a und b). Die Region *upstream* des Transkriptionsstarts weist bei Betrachtung der Mittelwerte aller analysierten CpGs eine signifikante ($p=0,001$) Abnahme um 11% auf, während diese in der Region unmittelbar vor dem Transkriptionsstart 16% beträgt ($p=0,01$). Die Gesamtmethylierung hingegen wird, wie bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt, in der *upstream* Region nur schwach um etwa 3% reduziert und in der nahe dem Transkriptionsstart nicht beeinflusst. Die Abnahme der Hydroxymethylierung nach CTCF Überexpression kann zudem

an allen analysierten CpGs beobachtet werden, wobei die CpGs, die jeweils in der CTCF-Bindestelle liegen (CpG2 in der *upstream* Region und CpG1 in der vor dem Transkriptionsstart gelegenen Region), die stärkste Reduktion der 5hmC-Level aufweisen.

Für die *AATK*-Promotorregion konnten keine Änderungen der 5hmC-Level nach CTCF Überexpression in H322 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

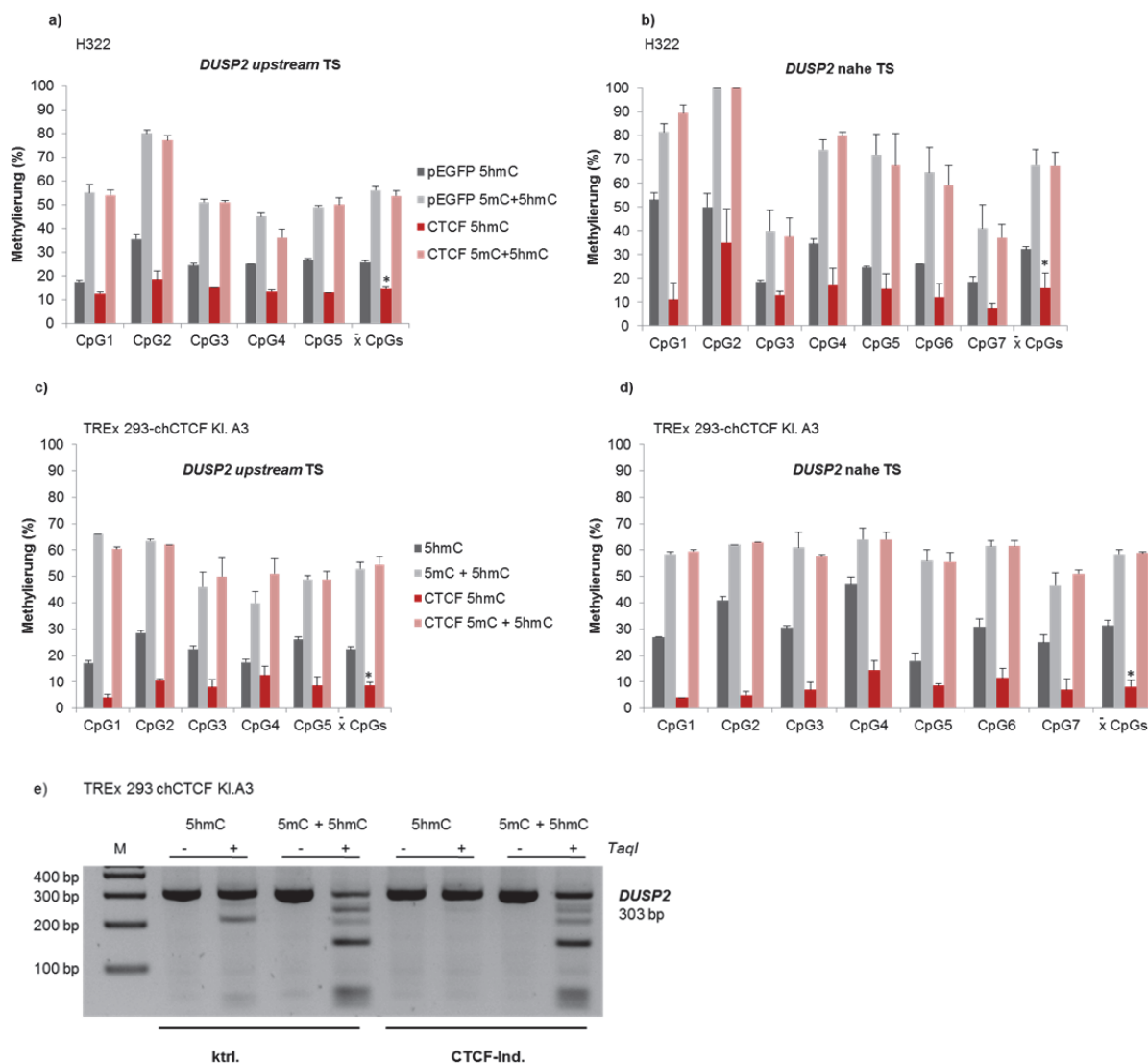


Abbildung 4-23: Abnahme der Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor nach transienter CTCF-Überexpression in H322-Zellen und nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen. H322-Zellen wurden transient mit chCTCF oder dem entsprechenden Leervektor transfiziert und nach 48 h die DNA isoliert. In TREx293-chCTCF-Zellen (Klon A3) wurde die CTCF-Expression durch Tetrazyklin induziert (CTCF-Ind.) und nach 48 h die DNA isoliert. Uninduzierte Zellen (ktrl.) wurden als Kontrolle verwendet. Im Anschluss folgte für beide Zelllinien die Durchführung des TAB-Sequencings, inklusive Amplifikation der *Bs*-DNA mit Gen-spezifischen Primern für *DUSP2*. Die 5-Hydroxymethylcytosin- (5hmC)-Level der mit mTet1 oxidierten Proben sowie die aus 5-Methylcytosin (5mC) und 5hmC bestehende Gesamtmethylierung aus nicht oxidierten Kontrollproben wurden mit Hilfe von Pyrosequenzierung (a-d) oder *TaqI*-Verdau (e) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erfasst. Mittels Pyrosequenzierung wurden zwei unterschiedliche Regionen innerhalb des *DUSP2*-Promotors analysiert, eine *upstream* des Transkriptionsstarts (TS) und eine unmittelbar vor dem TS. In die Auswertung einbezogen wurden die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten, wobei die Pyrosequenzierung jeweils dreimal wiederholt wurde. (*: signifikant; berechnet mit GraphPad *t test calculator*).

Die Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor wurde zudem in den induzierbaren TREx293-chCTCF-Zellen analysiert. Nach CTCF-Induktion mittels Tetrazyklinzugabe über 48 h wurde die DNA isoliert und TAB-Seq durchgeführt. In den mitgeführten uninduzierten

Zellen beträgt die durchschnittliche Gesamtmethylierung aller fünf pyrosequenzierten CpGs 53% in der Region *upstream* des Transkriptionsstarts; das durchschnittliche 5hmC Level aller analysierten CpGs liegt bei 22% (Abb. 4-23c). Nach CTCF-Induktion nimmt die Gesamtmethylierung aller fünf CpGs im Mittel um zwei Prozent zu, während das durchschnittliche 5hmC-Level um 13% abnimmt ($p=0,0001$). Eine Abnahme der Hydroxymethylierung ist, wie auch nach transientser CTCF-Überexpression in H322-Zellen an allen untersuchten CpGs festzustellen, wobei das in der CTCF-Bindestelle gelegene CpG2, wie auch in H322-Zellen, die stärkste Abnahme der Hydroxymethylierung aufweist. Die Region direkt vor dem Transkriptionsstart weist in uninduzierten Zellen eine durchschnittliche Gesamtmethylierung aller sieben analysierten CpGs von 59% auf, wobei 31% davon der Hydroxymethylierung zuzuordnen sind (Abb. 4-23d). Nach CTCF-Induktion ist keine Änderung der durchschnittlichen Gesamtmethylierung der sieben CpGs zu erfassen, die Hydroxymethylierung hingegen nimmt signifikant ($p=0,0001$) um 23% ab. Auch in diesem Fall kommt es zu einer Reduktion der Hydroxymethylierung an allen untersuchten CpGs, allerdings ist die stärkste Abnahme nicht dem, in der CTCF-Bindestelle gelegenen CpG zuzuordnen. Die Reduktion der Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor in TREx293-chCTCF-Zellen kann nicht nur durch Pyrosequenzierung erfasst werden, sondern auch mittels gelelektrophoretischer Auftrennung nach *TaqI*-Restriktion (Abb. 4-23e und Abb. 4-24a). Die Bandenmuster der Proben, die die Gesamtmethylierung (5mC + 5hmC) darstellen, sind nach *TaqI*-Verdau nahezu gleich und zeigen eine partielle Methylierung an. Die Restriktion der mit mTet1 oxidierten Proben (5hmC) ist deutlich geringer, wobei in den CTCF induzierten Zellen die Stärke der Restriktion und damit die Hydroxymethylierung im Vergleich zu den uninduzierten Zellen abnimmt (Abb. 4-23e).

Neben dem TAB-Seq wurde als zweite Methode zur Detektion der Hydroxymethylierung die *Methylated DNA-Immunoprecipitation* (MeDIP) im Labor etabliert und die TAB-Seq-Ergebnisse mit dieser Technik verifiziert. Hierbei wird die DNA mit 5hmC- und 5mC-spezifischen Antikörpern präzipitiert und die Methylierungslevel in der vorliegenden Arbeit jeweils mittels Gelelektrophorese nach Gen-spezifischer PCR erfasst. Die verwendeten Primer für die *DUSP2*-Promotorregion überlappen mit den COBRA-Primern, erfassen aber nicht die gleiche Region (Abb. 4-24a). Die MeDIP-Primer beinhalten ebenfalls die beiden CTCF-Bindestellen, die auch im COBRA-Amplifikat liegen. In uninduzierten TREx293-chCTCF-Zellen kann mit dem 5mC-Antikörper eine deutliche Methylierung der *DUSP2*-Promotorregion nachgewiesen werden (Abb. 4-24b). Nach CTCF-Induktion nimmt das 5hmC-Level deutlich ab. Als Kontrollregion wurde der in TREx293-chCTCF-Zellen unmethylierte *RASSF5C*-Promotor sowie β -Aktin in die Analysen mit einbezogen. Die PCR nach Präzipitation mit dem 5mC und dem 5hmC ergeben zwar Signale für die *RASSF5C*-Promotorregion, allerdings deutlich unter dem 10%-Input (Abb. 4-24b). Unterschiede vor und nach CTCF-Induktion sind ebenso wie bei β -Aktin nicht erkennbar (Abb. 4-24 b). Ähnliche Ergebnisse wurden für H322 nach transientser Überexpression von CTCF erzielt (Daten nicht gezeigt).

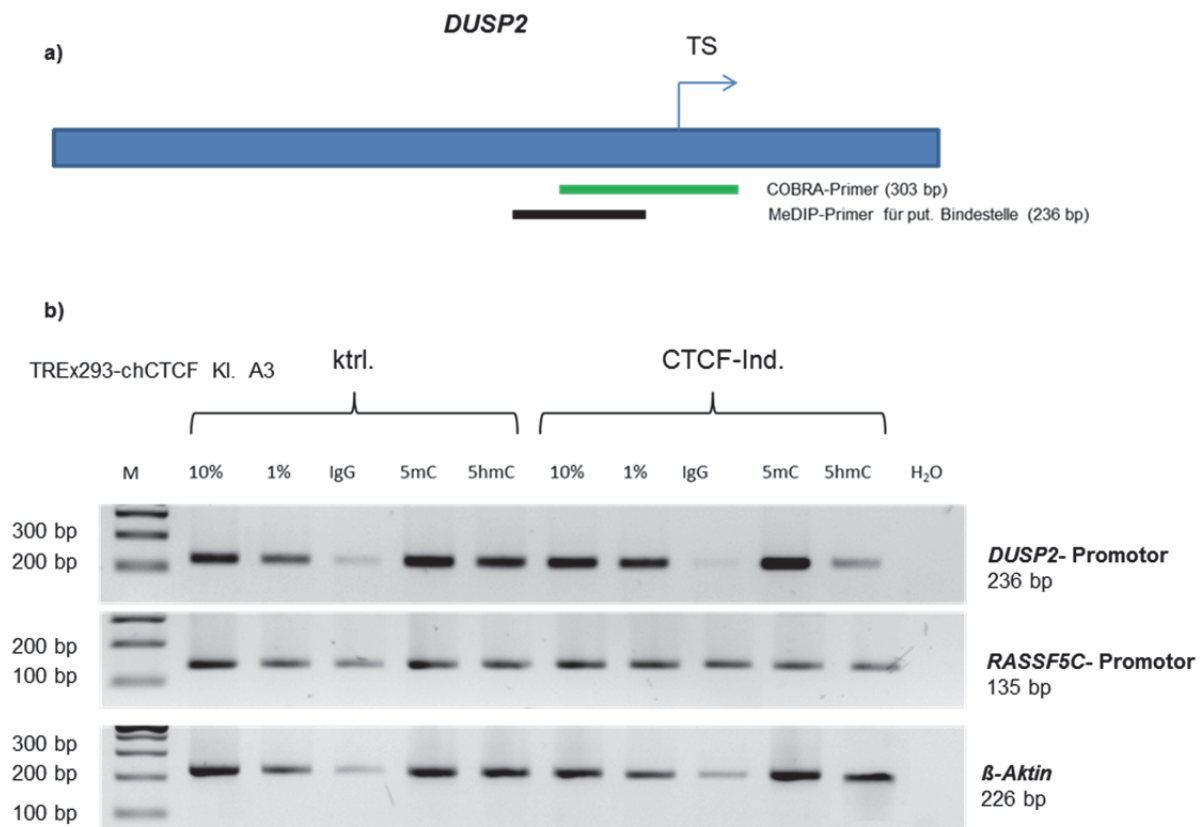
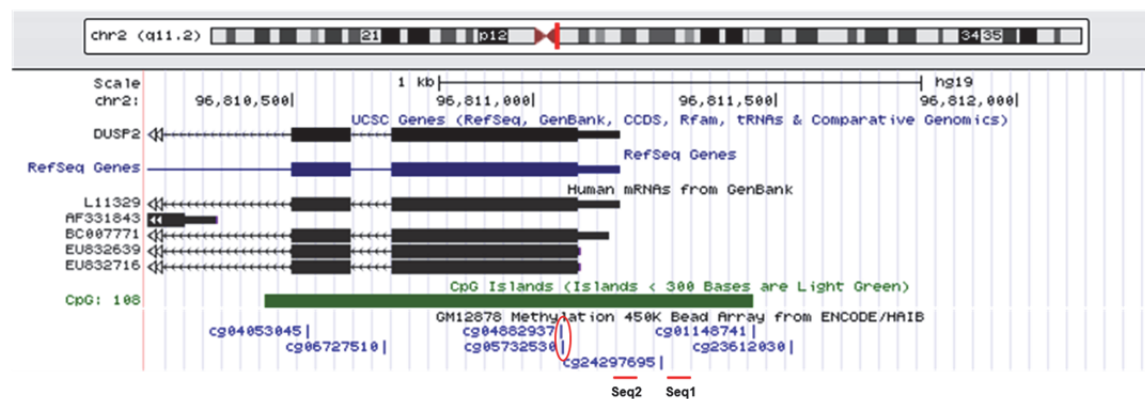


Abbildung 4-24: Mittels Methylated DNA-Immunoprecipitation (MeDIP) detektierte Abnahme der Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen. In TREx293-chCTCF-Zellen (Klon A3) wurde die CTCF-Expression durch Tetrazyklin induziert (CTCF-Ind.) und nach 48 h die DNA isoliert sowie MeDIP mit 5mC- und 5hmC-Antikörpern durchgeführt. Uninduzierte Zellen (ktrl.) wurden als Kontrollansatz mitgeführt. Der Nachweis der 5mC- und 5hmC-Level erfolgte nach Gen-spezifischer PCR durch elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel (b). Wie in a schematisch dargestellt, überlappen die für die Analyse der *DUSP2*-Region verwendeten MeDIP-Primer mit den COBRA-Primern, erfassen jedoch nicht die gleichen Regionen (a). Die *RASSF5C*-Promotorregion wurde als Kontrolle für eine unmethylierte Region verwendet. β -Aktin diente ebenfalls als Kontrolle, da hier keine Unterschiede vor und nach CTCF-Induktion zu erwarten sind. (TS: Transkriptionsstart)

Genomweite Methylierungsänderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen wurden mit Hilfe eines Infinium *HumanMethylation450K BeadChip Arrays* analysiert (siehe Punkt 4.7). Um auch die 5hmC Level zu erfassen, wurde für diesen *Array* neben Bisulfit-DNA, zuvor glykosylierte und mit mTET1 oxidierte BS-DNA verwendet (TAB-Seq). Der *Screen* umfasste auch CpGs innerhalb des *DUSP2*-Promotors sowie in intragenischen Regionen. Die Lage dieser CpGs ist Abbildung 4-25a zu entnehmen. Der *Array* beinhaltet keine CpGs, die im Rahmen dieser Arbeit mittels Pyrosequenzierung analysiert wurden (Abb. 4-25a). Dennoch weist auch der *Screen* darauf hin, dass nach CTCF-Induktion an zwei CpGs (cg04882937 und cg05732530), die in der *DUSP2*-Promotor-CpG-Insel liegen, die Hydroxymethylierung deutlich abnimmt (Abb. 4-25b). Das CpG (cg24297695), das zwischen den beiden Regionen liegt, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, weist eine leichte Zunahme der 5hmC-Level nach CTCF-Induktion auf (Abb. 4-25b). Bei intragenisch gelegenen CpGs kann sowohl eine Abnahme (cg06727510) als auch eine Zunahme (cg04053045) der 5hmC-Level nach CTCF-Induktion beobachtet werden. Auf weitere Ergebnisse des *Screens* wird unter Punkt 4.7 näher eingegangen.

a)



b)

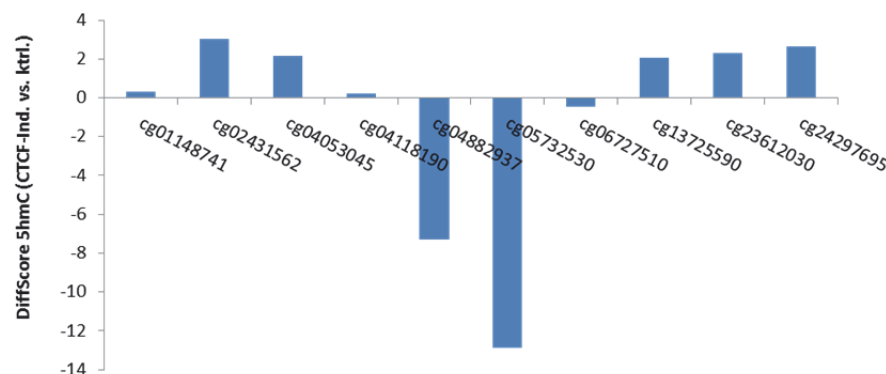


Abbildung 4-25: Mittels Infinium HumanMethylation450K BeadChip Array detektierte Abnahme der Hydroxymethylierung an weiteren CpGs innerhalb des *DUSP2*-CpG-Insel-Promotors nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen. a) UCSC Genome Browser-Darstellung von *DUSP2*. Die CpGs, die im durchgeführten Infinium HumanMethylation450K BeadChip Array eine Abnahme der 5hmC-Level infolge der CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen aufweisen, sind rot umkreist. Ebenfalls gekennzeichnet sind die Regionen, die mittels Pyrosequenzierung untersucht wurden (Seq1 und Seq2). b) In TREx293-chCTCF-Zellen wurde mittels Tetrazyklin über 48 h die CTCF-Expression induziert. Eine uninduzierte Kontrolle wurde mitgeführt. Im Anschluss folgte die Isolation der DNA sowie die Glykosylierung und Oxidation mit mTet1, wobei eine unbehandelte DNA als Kontrolle diente. Die Bisulfitkonvertierung und ein Infinium HumanMethylation450K BeadChip Array wurden bei Life & Brain, Bonn durchgeführt. In b dargestellt sind die Änderungen der 5hmC-Level einzelner CpGs, wobei der DiffScore zwischen dem durchschnittlichen Signal für 5hmC der uninduzierten Zellen (ktrl.) gegen die mit CTCF induzierten Zellen (CTCF-Ind.) aufgetragen wurde. In die Auswertung wurden zwei biologische Replikate mit einbezogen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor nach CTCF-Überexpression in Zellen mit stark oder partiell methyliertem *DUSP2*-Promotor signifikant abnimmt. Bereits hinter dem Transkriptionsstart, aber innerhalb der CpG-Insel, gelegene CpGs, weisen in Zellen mit partiell methyliertem *DUSP2*-Promotor ebenfalls eine Reduktion der 5hmC-Level nach CTCF-Induktion auf.

4.4.8.1 Auswirkung der Depletion von CTCF auf die Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor

Da die vorangegangenen Experimente eine Abnahme der Hydroxymethylierung am partiell und stark methylierten *DUSP2*-Promotor infolge einer CTCF-Überexpression aufgezeigt haben, wurde in nachfolgenden Analysen die Auswirkung eines CTCF-Knockdowns mittels siRNA in HeLa-Zellen mit unmethyliertem *DUSP2*-Promotor untersucht, mit der Hypothese, dass der CTCF-Knockdown einen gegenteiligen Effekt, d.h. eine Zunahme der Hydroxymethylierung herbeiführt. Wie bereits unter Punkt 4.4.4 beschrieben, führt die Depletion von CTCF nicht zu einer Änderung der durchschnittlichen Gesamt-methylierung aller *upstream* des

Transkriptionsstarts untersuchten CpGs in der *DUSP2*-Promotorregion (Abb. 4-26). Auch die durchschnittliche Hydroxymethylierung dieser fünf untersuchten CpGs weist keine Änderung nach CTCF-*Knockdown* auf (Abb. 4-26).

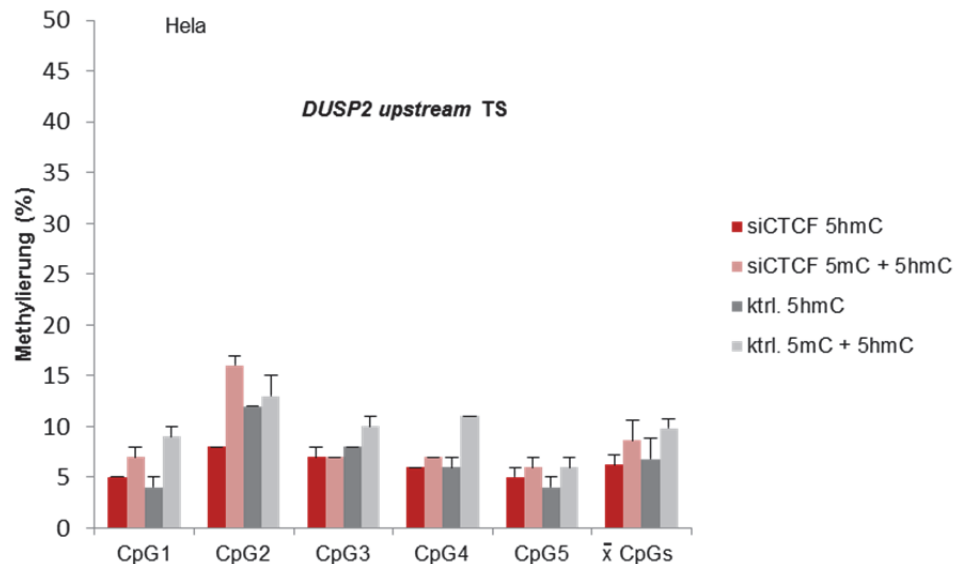


Abbildung 4-26: Auswirkung der CTCF-Depletion auf die Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor. HeLa-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Mix aus fünf unterschiedlichen siRNAs gegen hCTCF bzw. einer Kontroll-siRNA (ktrl.) transfiziert. Nach 96 h folgte die DNA-Isolation, Bisulfit-Behandlung und Amplifikation mit Gen-spezifischen Primern (biotinylierter *Reverse-Primer*). Im Anschluss wurde die *DUSP2*-Region *upstream* des Transkriptionsstarts (TS) Pyrosequenziert. Es sind sowohl die prozentualen Methylierungswerte der einzelnen untersuchten CpG-Dinukleotide, als auch die durchschnittliche Methylierung aller fünf in dieser Region befindlichen CpG-Dinukleotide dargestellt. Es wurden die Ergebnisse aus zwei CTCF-*Knockdowns* berücksichtigt, wobei die Pyrosequenzierung jeweils dreimal wiederholt wurde.

Einzig an CpG2, das in der CTCF-Bindestelle liegt, ist eine schwache Änderung der Hydroxymethylierung erkennbar, allerdings handelt es sich um eine Abnahme des 5hmC-Levels um 4% nach CTCF-*Knockdown*. Die Gesamtmethylierung hingegen nimmt an CpG2 nach CTCF-*Knockdown* um 3% zu. Die Gesamtmethylierung der analysierten *DUSP2*-Promotorregion ist in HeLa-Zellen mit knapp 10% sehr gering, die Hydroxymethylierung nimmt mit knapp 70% davon einen Großteil ein.

Zusammenfassend betrachtet führt die Depletion von CTCF in HeLa-Zellen weder zur Änderung der Gesamtmethylierung, noch der Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor.

4.5 Einfluss des CTCF-Paralogs BORIS (CTCF1) auf die RNA-Expression von *AATK*- und *DUSP2* sowie auf die *DUSP2*-Promotormethylierung

BORIS stellt den paralogenen Faktor von CTCF dar, wobei BORIS im Gegensatz zu CTCF ausschließlich im Testis-Gewebe und diversen Krebsarten exprimiert wird (Loukinov *et al.*, 2002, Vatolin *et al.*, 2005). Über BORIS ist bekannt, dass er methylierte DNA binden kann (Nguyen *et al.*, 2008). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob BORIS sich bei transienter Überexpression anders als CTCF auf die RNA-Expression von *AATK*- und *DUSP2* sowie auf die *DUSP2*-Promotormethylierung auswirkt.

Mittels qualitativer RT-PCR kann nach 48-stündiger, transientser hBORIS-Überexpression keine Änderung der *AATK*- und *DUSP2*-RNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4-27c).

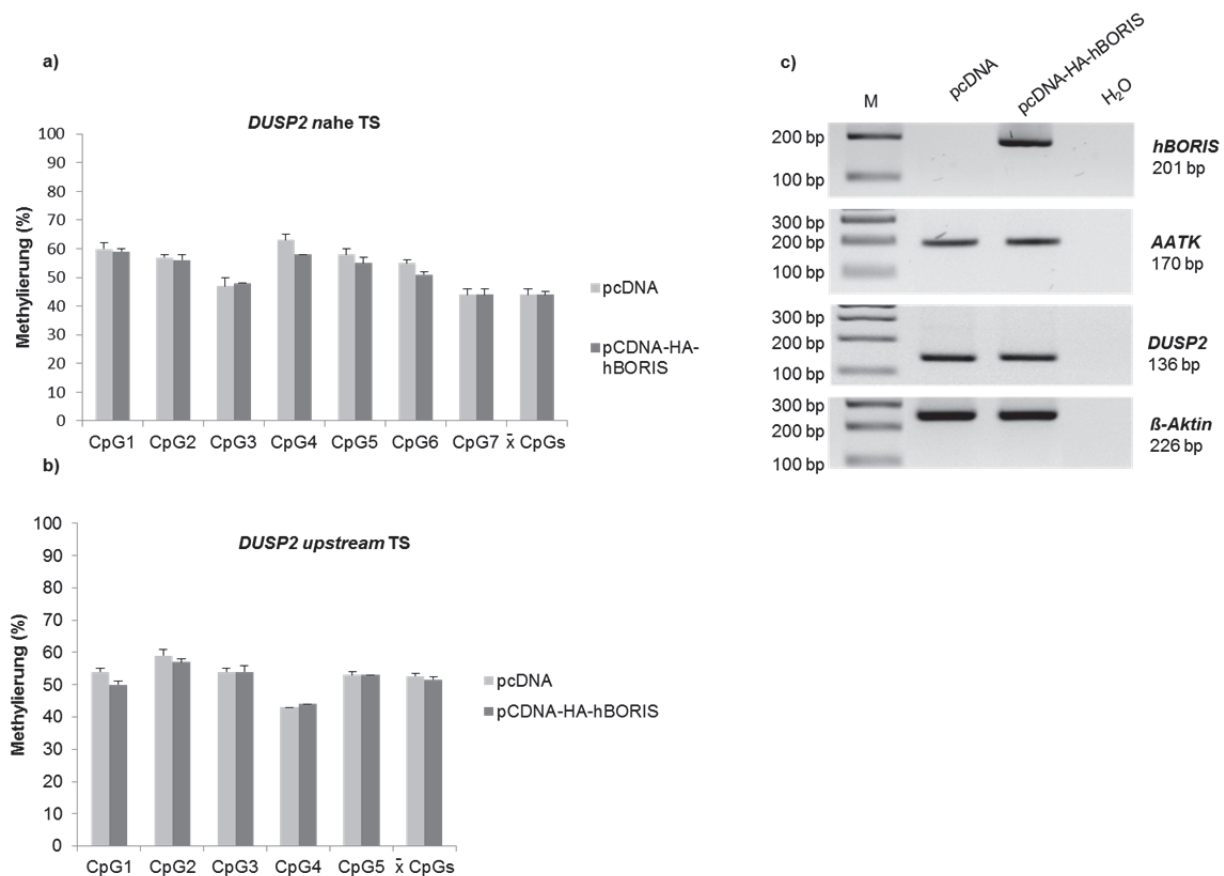


Abbildung 4-27: *AATK*- und *DUSP2*-RNA-Expression sowie *DUSP2*-Promotormethylierung nach transientser Überexpression des CTCF-Paralogs BORIS (CTCF). HEK-Zellen wurden mit pcDNA-HA-BORIS oder dem passenden Leervektor transfiziert und nach 48 h die RNA und DNA isoliert. Für Expressionsanalysen wurde die RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Durchführung einer RT-PCR mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren. Der Expressionsnachweis wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht. Eine RT-PCR mit dem *housekeeping*-Gen β -Aktin wurde durchgeführt, um nachweisen zu können, dass äquivalente Mengen an cDNA amplifiziert wurden (c). Die DNA wurde Bisulfit-behandelt, mit Gen-spezifischen Primern amplifiziert (reverser Primer biotinyliert) und Pyro-sequenziert (a,b). Betrachtet wurden zwei unterschiedliche Regionen innerhalb des *DUSP2*-Promotors; eine unmittelbar vor dem Transkriptionsstart (TS), eine *upstream* des TS. Dargestellt sind die Methylierungswerte der einzelnen, analysierten CpGs sowie der Durchschnittswert aller in einer Region untersuchten CpG-Dinukleotide zusammen. In die Auswertung einbezogen wurden die Werte aus drei Pyrosequenzierungen.

Eine Änderung der durchschnittlichen *DUSP2*-Promotormethylierung ist ebenfalls nicht erkennbar; weder bei Betrachtung des Mittelwerts aller analysierten CpGs in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts, noch in der *upstream*-Region (Abb. 4-27a,b). Kleinere Unterschiede einzelner CpGs sind zu beobachten, allerdings liegen die Änderungen maximal im Bereich von 5%. So weisen zum Beispiel die CpGs 4-6 in der Region unmittelbar vor dem Transkriptionsstart leichte demethylierende Effekte zwischen 3% und 5% nach BORIS-Überexpression auf (Abb.4-27a). In der *upstream*-Region ist eine schwache Abnahme der Methylierung von 4% an CpG1 und 2% an CpG2 zu erkennen, während alle anderen CpGs nicht beeinflusst werden (Abb.4-27b).

Insgesamt betrachtet führt die transiente Überexpression von BORIS weder zu Veränderungen der *AATK*- und *DUSP2*-RNA-Expression, noch zu signifikanten Effekten hinsichtlich der *DUSP2*-Promotormethylierung.

4.6 Einfluss von CTCF auf die RNA-Expression von *TET1*, *TET2* und *TET3*

Die, zur Familie der DNA-Hydroxylasen zugehörigen, TET (*Ten-eleven-translocation*)-Proteine führen die Hydroxymethylierung aus, indem sie 5-Methylcytosin (5mC) in einer Oxidationsreaktion zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) konvertieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von CTCF auf die RNA-Expression von TET1-3 analysiert. Dazu wurde chCTCF in den TREx293-chCTCF-Zellen induziert oder ein CTCF-*Knockdown* in HEK-Zellen durchgeführt und im Anschluss jeweils die RNA-Expression von TET1-3 betrachtet. Nach CTCF-Induktion mittels Tetrazyklin in den TREx293-chCTCF-Zellen nimmt die *TET1*-Expression um etwa 35% ab und die *TET2*-Expression wird um ca. 15% reduziert, während die *TET3*-Expression unverändert bleibt (Abb. 4-28a). Nach CTCF-*Knockdown* in HEK-Zellen wird die *TET1* und *TET2*-RNA-Expression um etwa die Hälfte vermindert; die *TET3*-Expression ändert sich nicht (Abb. 4-28b). Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch in H322-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

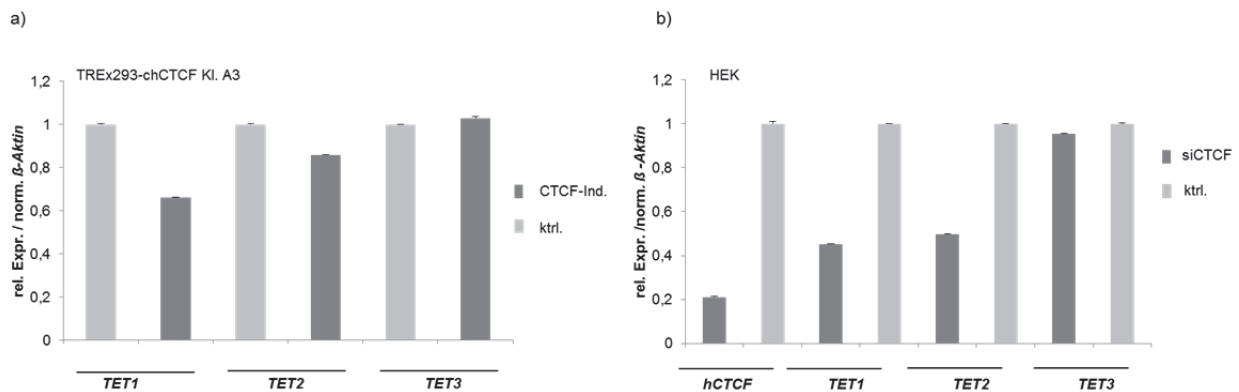


Abbildung 4-28: Einfluss von CTCF auf die RNA-Expression von *TET1*, *TET2* und *TET3*. a) TREx293- Zellen, die stabil den Tet-Repressor exprimieren, wurden mit dem Expressionsvektor pcDNA4TO-chCTCF transfiziert und über Zeocin selektioniert. Die chCTCF-Expression wurde durch Zugabe von Tetrazyklin (5 µl/ml) über zwei Tage ermöglicht. Der Einfluss der CTCF-Induktion (CTCF-Ind.) auf die RNA-Expression von *TET1*-3 wurde mittels quantitativer RT-PCR erfasst, wobei die spezifische Genexpression auf β -Aktin normalisiert und die Werte der uninduzierten Kontrolle (ktrl.) gleich eins gesetzt wurden. Die Auswertung beinhaltet die Daten aus drei unabhängigen Experimenten, wobei für jede qRT-PCR Triplikate bestimmt wurden. b) HEK-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Mix aus fünf unterschiedlichen siRNAs gegen hCTCF bzw. einer Kontroll-siRNA (ktrl.) transfiziert. Nach 96 h folgte die Extraktion der RNA, die Umschreibung der RNA mittels Reverser Transkription in cDNA und im Anschluss die Amplifikation mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren mittels qPCR. Normalisiert wurde auf β -Aktin und die Expression der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Werte aus zwei unabhängigen CTCF-*Knockdowns* wurden gemittelt, wobei in jeder qRT-PCR Triplikate bestimmt wurden.

In Folgeexperimenten wurden hTET1 sowie die katalytische Domäne von hTET2 (TET2 CD), über die die Oxidation von 5mC zu 5hmC erfolgt, in HEK-Zellen transient überexprimiert und die Auswirkung auf die *DUSP2*-RNA-Expression untersucht. Die Überexpression von TET1 (Abb. 4-29b) hat zur Folge, dass die *DUSP2*-RNA-Expression um etwa 40% reduziert wird (Abb. 4-29a). Nach Überexpression der katalytischen Domäne von TET2 (Abb. 4-29c) nimmt die *DUSP2*-RNA-Expression leicht, um 8% zu (Abb. 4-29a).

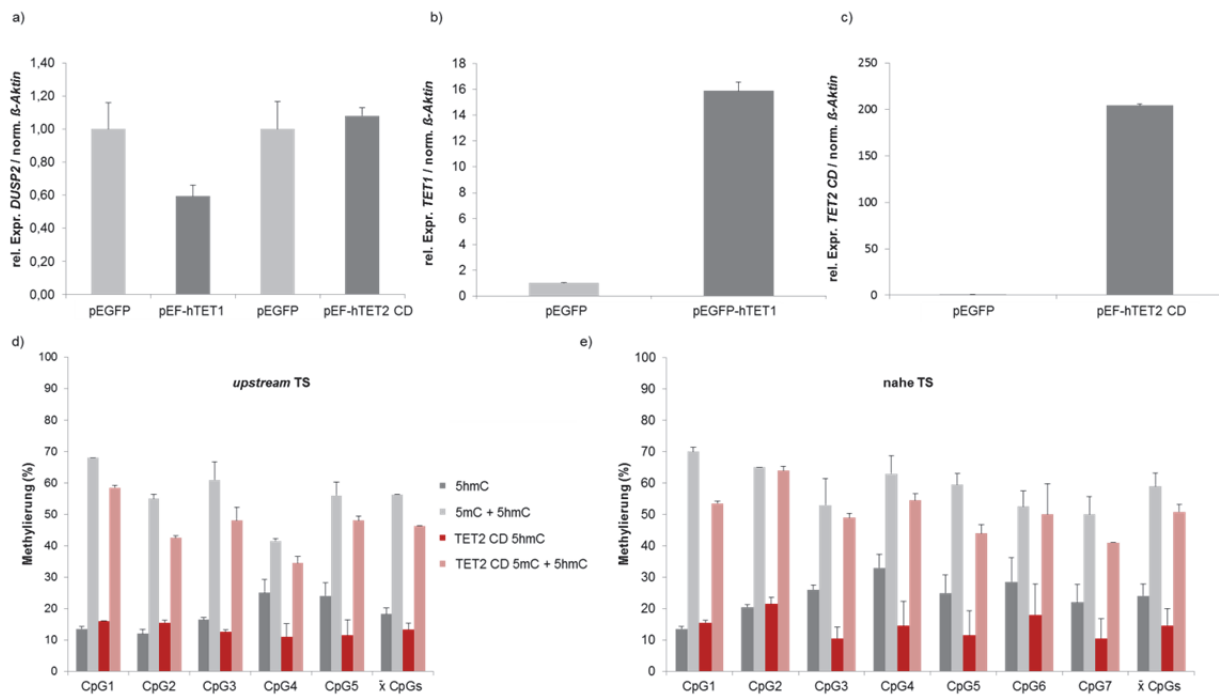


Abbildung 4-29: Auswirkung der Überexpression der katalytischen Domäne von TET2 auf die RNA-Expression und Promotormethylierung von *DUSP2* sowie Einfluss von TET1 auf die *DUSP2*-RNA-Expression. HEK-Zellen wurden mit pEF-hTET1 oder pEF-hTET2 CD und pEGFP als Leervektorkontrolle transfiziert, die RNA nach 48 h isoliert und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Expression von *TET1* (b), *TET2* (c) und *DUSP2* (a) wurde mittels qRT-PCR bestimmt und auf β -Aktin normalisiert. Die Expression der Leervektorkontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Neben der RNA wurde die DNA nach Überexpression von pEF-hTET2 und pEGFP isoliert, TAB-Seq durchgeführt, inklusive Amplifikation der Bisulfit-DNA mit Gen-spezifischen Primern für *DUSP2*. Die 5-Hydroxymethylcytosin- (5hmC)-Level der mit mTet1 oxidierten Proben sowie die aus 5-Methylcytosin (5mC) und 5hmC bestehende Gesamtmethylierung aus nicht oxidierten Kontrollproben wurden mit Hilfe von Pyrosequenzierung erfasst (d,e). Es wurden zwei unterschiedliche Regionen innerhalb des *DUSP2*-Promotors analysiert, eine *upstream* des Transkriptionsstarts (TS) und eine unmittelbar vor dem TS, wobei die Pyrosequenzierung jeweils dreimal wiederholt wurde.

Nach Überexpression der katalytischen Domäne von TET2 in HEK-Zellen wurde zudem die Gesamtmethylierung sowie die Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor analysiert. Den Ergebnissen zufolge führt die Überexpression der katalytischen Domäne von TET2 zu einer Abnahme der durchschnittlichen Gesamtmethylierung aller analysierten CpGs sowohl der *upstream* des Transkriptionsstarts gelegenen Region, als auch der Region direkt vor dem Transkriptionsstart (Abb. 4-29d,e). Im *upstream*-Bereich wird die Gesamtmethylierung um 10%, direkt vor dem Transkriptionsstart um 8% reduziert. Zudem ist die Abnahme der Gesamtmethylierung an allen CpGs beider Regionen zu beobachten. Auch die durchschnittliche Hydroxymethylierung beider analysierter Regionen wird durch die TET2 CD-Überexpression verringert (Abb. 4-29d,e), wobei dieser Effekt unmittelbar vor dem Transkriptionsstart mit einer Änderung um 9% (Abb. 4-29e) doppelt so stark ist, wie *upstream* des Transkriptionsstarts (Abb. 4-29d). In beiden untersuchten Regionen ist nicht an allen CpGs eine Abnahme der Hydroxymethylierung erkennbar. Distal weisen, die in einer CTCF-Bindestelle gelegenen CpGs 1 und 2 nach TET2 CD-Überexpression eine schwache Zunahme der 5hmC-Level auf, während an allen anderen CpGs eine Abnahme zu erfassen ist, wobei CpG4 und CpG5 die größten Änderungen zeigen (Abb. 4-29d). In der Region direkt vor dem Transkriptionsstart ist eine Zunahme der Hydroxymethylierung nach TET2 CD-Überexpression ebenfalls an dem, in der CTCF-Bindestelle (CpG1) oder unmittelbar daneben gelegenen CpG (CpG2) zu beobachten (Abb. 4-29e). Die CpGs 3-7 hingegen zeigen jeweils eine deutliche Abnahme der 5hmC-Levels infolge der TET2 CD-Überexpression.

Die Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor in Folge einer TET1-Überexpression konnte aufgrund von schlechter DNA-Qualität bislang nicht analysiert werden.

Zusammengefasst zeigen die zuvor beschriebenen Experimente zum Einen, dass CTCF die RNA-Expression von *TET1* und *TET2*, nicht aber *TET3* beeinflusst. Zum Anderen konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von TET1 in einer reduzierten *DUSP2*-RNA-Expression resultiert, wo hingegen die Überexpression der katalytischen Domäne von TET2 die *DUSP2*-RNA-Expression leicht verstärkt und gleichzeitig eine Demethylierung am *DUSP2*-Promotor bewirkt, wobei sowohl die Gesamtmethylierung als auch die Hydroxymethylierung reduziert wird.

4.7 Genomweite Analyse der 5mC- und 5hmC-Level und RNA-Expressionsänderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen sowie RNA-Expressionsänderungen nach transients BORIS-Überexpression in HEK-Zellen

Die genomweiten Veränderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen hinsichtlich Gesamtmethylierung, 5hmC-Level und RNA-Expressionsänderung wurden mittels eines Infinium *HumanMethylation450K BeadChip Arrays* bzw. eines *Affymetrix human ST 1.0 S Arrays* bestimmt. Genomweite Expressionsänderungen nach transients hBORIS-Überexpression in HEK-Zellen wurden ebenfalls mittels eines *Affymetrix human ST 1.0 S Arrays* analysiert.

4.7.1 Genomweite Änderungen der Gesamt- und Hydroxymethylierung nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen

Um die genomweiten Veränderungen der Gesamt- und Hydroxymethylierung nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen zu untersuchen, wurde die CTCF-Expression durch Tetrazyklin induziert bzw. uninduzierte Zellen als Kontrolle verwendet. Im Anschluss folgte die *Tet assisted bisulfite*-Konvertierung zur Bestimmung des 5hmC-Gehalts. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt, um neben den 5hmC-Level auch die Gesamtmethylierung zu erfassen. Die aufgereinigte DNA wurde bei Life & Brain, Bonn Bisulfit-behandelt und ein Infinium *HumanMethylation450K BeadChip Array* zur Analyse von mehr als 480000 CpGs durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit M. Bartkuhn und M. Schneider (Institut für Genetik, Gießen) mit Hilfe der *Software* Genome Studio und R.

Betrachtet man die Delta Beta-Werte zwischen uninduzierten und CTCF-induzierten Zellen, an allen mittels 450K-Array untersuchten CpGs, angeordnet nach Stärke der Veränderung (Abb. 4-30), stellt man fest, dass der Großteil, der im Array enthaltenen CpGs, keine Änderung der Gesamt- und Hydroxymethylierung aufweist. Die Werte streuen überwiegend um den Nullpunkt. Allerdings kann man für einige CpGs sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der Gesamt- (Abb. 4-30a) oder Hydroxymethylierung (Abb. 4-30b) erkennen. Weiterhin fällt auf, dass CTCF die 5hmC-Level deutlich stärker beeinflusst, als die Gesamtmethylierung. Betrachtet man beispielsweise das Intervall -0,2 bis -0,4, d.h. die CpGs, die infolge der CTCF-Induktion eine Methylierungsreduktion aufweisen, beobachtet

man, dass deutlich mehr CpGs eine Änderung der 5hmC-Level (Abb. 4-30b), als der Gesamtmethylierung (Abb. 4-30a) zeigen. Das gleiche gilt für den umgekehrten Fall, d.h. es finden sich deutlich mehr CpGs mit einer Zunahme der 5hmC-Level (Abb. 4-30b) als mit steigender Gesamtmethylierung (Abb. 4-30a) nach CTCF-Induktion.

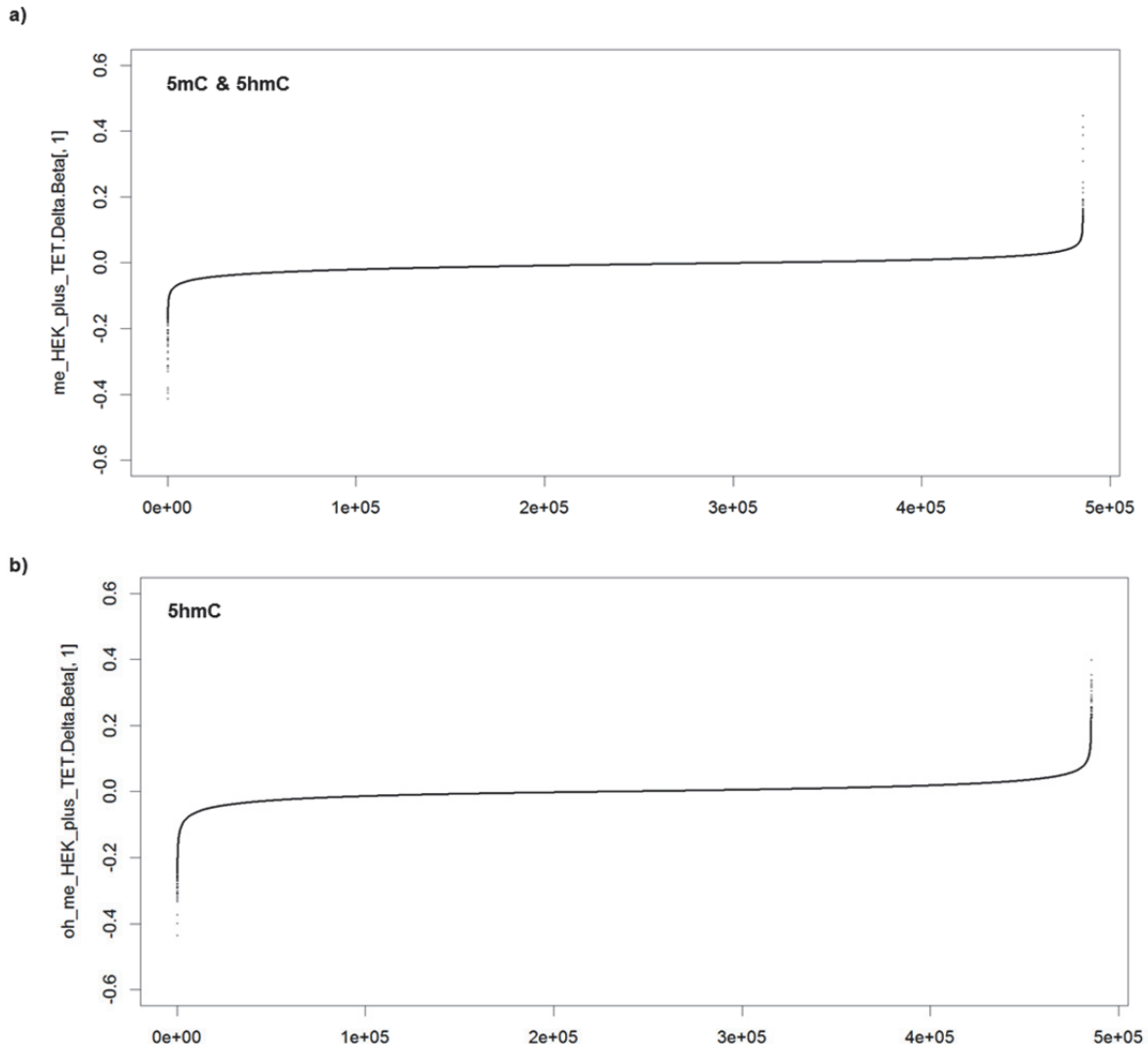
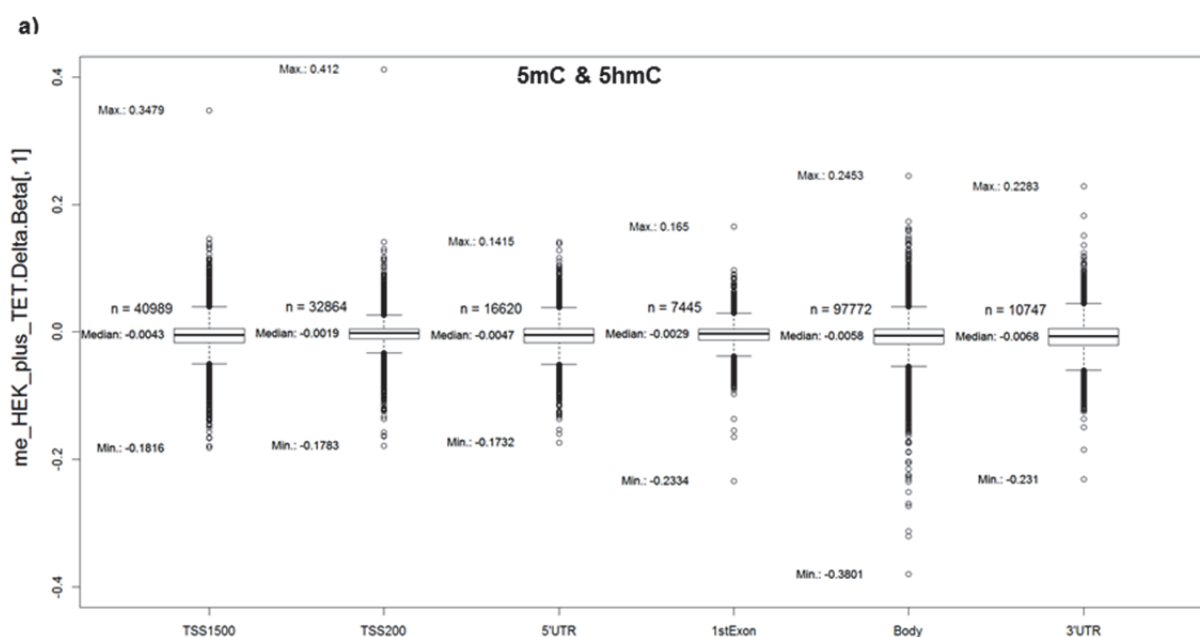


Abbildung 4-30: Genomweite Änderungen nach CTCF-Induktion in TReX293-chCTCF der Gesamtmethylierung (5mC & 5hmC) sowie der Hydroxymethylierung (5hmC). In TReX293-chCTCF-Zellen wurde die Expression von chCTCF durch Tetrazyklinzugabe zum Medium induziert. Uninduzierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach 48 h wurde die DNA isoliert, glykosyliert und mit mTet1 oxidiert. Dieser Ansatz diente zum Erfassen der 5hmC-Level. Ein weiterer, unbehandelter Ansatz wurde zur Analyse der Gesamtmethylierung genutzt. Die aufgereinigte DNA wurde bei Life & Brain, Bonn Bisulfit-behandelt und ein *Infinium HumanMethylation450K BeadChip Array* durchgeführt. Dargestellt sind die Delta Beta-Werte zwischen uninduzierten und CTCF-induzierten Zellen, an allen mittels 450K-Array untersuchten CpGs, angeordnet nach stärkster Abnahme bis höchster Zunahme der Methylierung. a zeigt dabei die Veränderungen der Gesamtmethylierung (5mC und 5hmC), b die Veränderungen der 5hmC-Level. In die Auswertung wurden die Ergebnisse von zwei biologischen Replikaten einbezogen. Die bioinformatische Auswertung mittels des Programms R erfolgte durch M. Schneider unter Anleitung von M. Bartkuhn.

Des Weiteren wurde analysiert, an welchen Genregionen sich die Änderungen nach CTCF-Induktion ereignen. Dazu wurden die Delta Beta-Werte zwischen uninduzierten und CTCF-induzierten Zellen bezüglich der Gesamtmethylierung und der Hydroxymethylierung an definierten Regionen relativ zum Transkriptionsstart (TSS) betrachtet (Abb.4-31). Wiederum ist zu erkennen, dass der Großteil der CpGs weder Änderungen in der Gesamt- (Abb. 4-31a)

noch in der Hydroxymethylierung aufweist (Abb. 4-31b). Der Median, der das Mittel der Veränderung angibt, liegt bei allen Regionen um Null. Es sind jedoch auch Ausreiser erkennbar, die sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Gesamt- oder Hydroxymethylierung zeigen. Die stärksten Änderungen, Gesamt- und Hydroxymethylierung betreffend, liegen im *Genebody* vor (Abb. 4-31a,b). Bezüglich der Hydroxymethylierung finden sich aber auch Änderungen im Bereich des ersten Exons sowie der Regionen TSS1500 (-1500 bis TS) und TSS200 (-200 bis TS). In der TSS200-Region weisen viele der Ausreiser-CpGs eine Abnahme der Hydroxmethylierung nach CTCF-Induktion auf (Abb. 4-31b). Insgesamt betrachtet sind auch bei dieser Darstellungsform die Änderungen der 5hmC-Level nach CTCF-Induktion deutlich stärker, als die der Gesamtmethylierung.



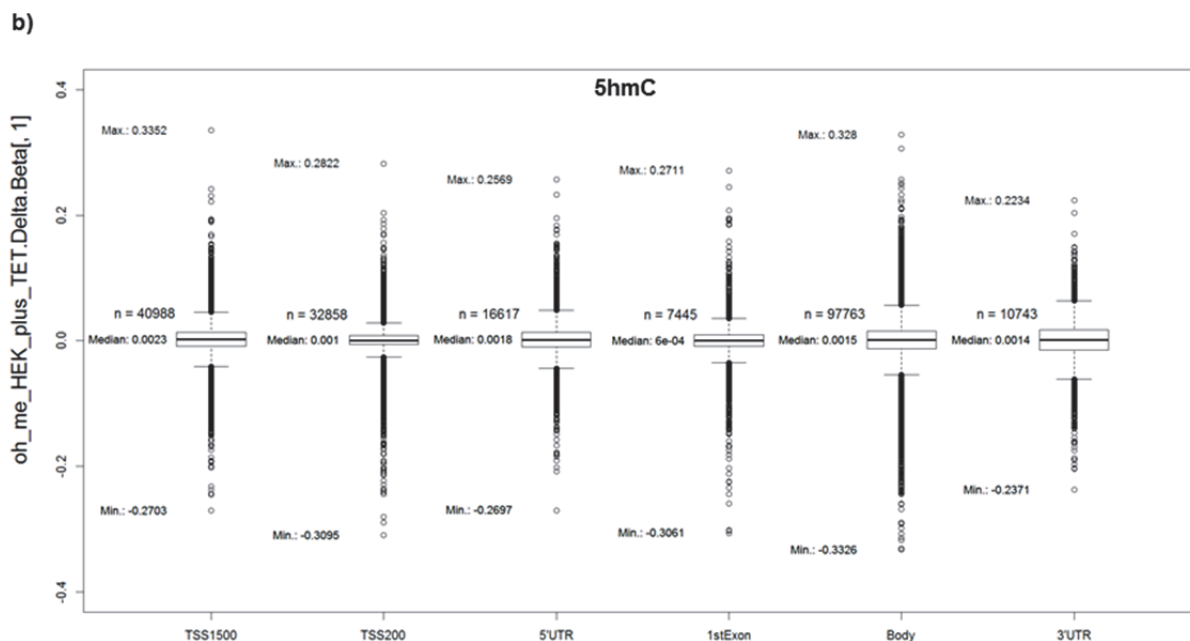


Abbildung 4-31: Genomweite Änderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF der Gesamtmethylierung (5mC & 5hmC) sowie der Hydroxymethylierung (5hmC) an definierten Regionen. In TREx293-chCTCF-Zellen wurde die Expression von chCTCF durch Tetrazyklinzugabe zum Medium induziert. Uninduzierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach 48 h wurde die DNA isoliert, glykosyliert und mit mTet1 oxidiert. Dieser Ansatz diente zum Erfassen der 5hmC-Level. Ein weiterer, unbehandelter Ansatz wurde zur Analyse der Gesamtmethylierung genutzt. Die aufbereitete DNA wurde bei Life & Brain, Bonn Bisulfit-behandelt und ein Infinium *HumanMethylation450K BeadChip Array* durchgeführt. Dargestellt ist die Differenz (Delta Beta) zwischen den Beta Werten der uninduzierten und CTCF-induzierten Zellen bezüglich der Gesamtmethylierung (a) und der Hydroxymethylierung (b) an definierten Region relativ zum Transkriptionsstart (TSS). Es wurden dabei alle CpGs einbezogen, die eine Zuordnung zu einer der Relativregionen zum TSS besitzen, wobei n die Anzahl an CpGs angibt, die dargestellt sind. In die Auswertung wurden die Ergebnisse von zwei biologischen Replikaten einbezogen. Die bioinformatische Auswertung mittels des Programms R erfolgte durch M. Schneider unter Anleitung von M. Bartkuhn.

Diese Befunde zeigen, dass CTCF die Hydroxymethylierung stärker als die Gesamtmethylierung beeinflusst.

4.7.2 Genomweite Expressionsänderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen sowie RNA-Expressionsänderungen nach transientser BORIS-Überexpression in HEK-Zellen

Parallel zur genomweiten Methylierungsanalyse wurden genomweite RNA-Expressionsänderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen mittels eines *Affymetrix human ST 1.0 S Array* analysiert. Die ermittelten Expressionsdaten der induzierten Zellen wurden auf die uninduzierten normalisiert. Als Veränderung interpretiert wurden Werte, die einen Unterschied von mehr bzw. weniger als 0,3 (30%) aufweisen. Mit den Methylierungsdaten korrelierend, zeigen die im *Array* enthaltenen Gene keine starken Veränderungen der Expression nach CTCF-Induktion (Abb. 4-32a). Bei 86% (25841 Gene) bleibt die RNA-Expression unverändert, bei 9% (2721 Gene) ist eine Hochregulation von mehr als 30% zu beobachten und 5% (1502 Gene) reagieren auf die CTCF-Induktion mit einer Abnahme der RNA-Expression um mehr als 30% (Abb. 4-32a). In Tabelle 4-3 sind beispielhaft die Gene dargestellt, die die größten Expressionsänderungen nach CTCF-Induktion aufzeigen.

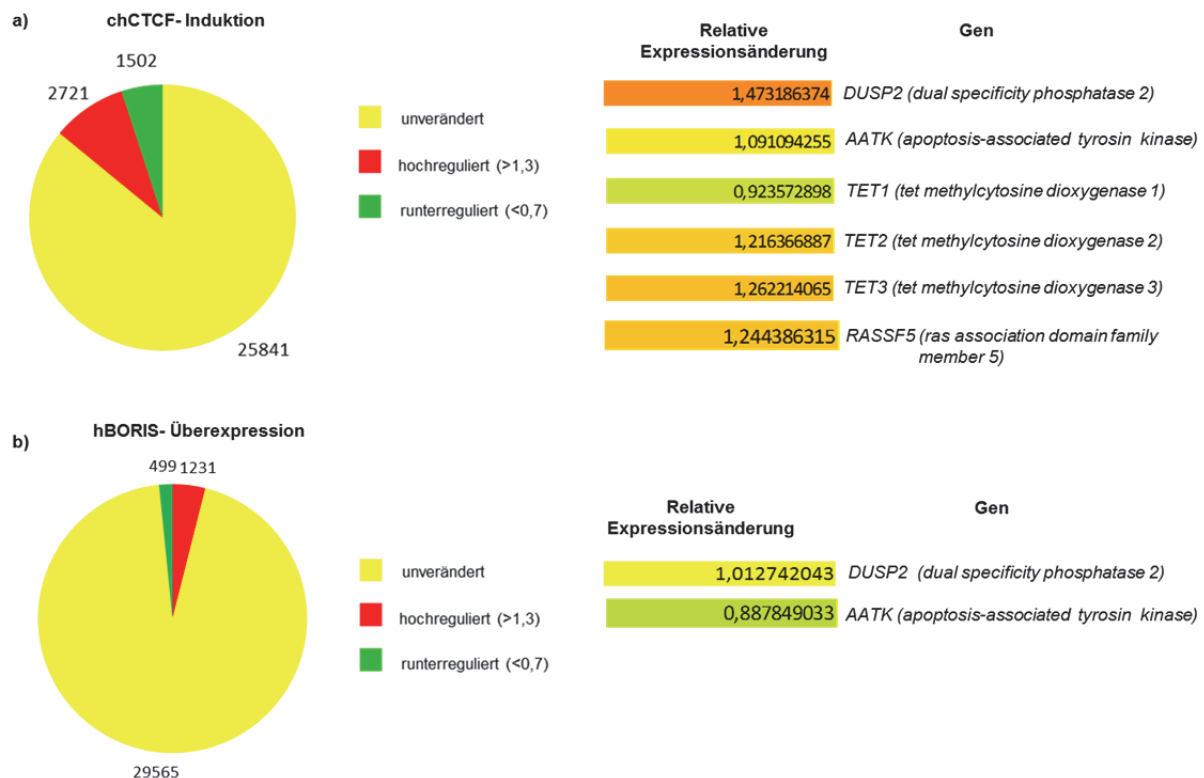


Abbildung 4-32: Genomweite Änderungen der RNA-Expression nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen (a) und nach hBORIS-Überexpression in HEK-Zellen (b). Die CTCF-Expression wurde in TREx293-chCTCF-Zellen durch Tetrazyklin über 48 h induziert. Als Negativkontrolle wurden uninduzierte Zellen mitgeführt. HEK-Zellen wurden mit pcDNA3-hBORIS oder dem zugehörigen Leervektor transient transfiziert und nach 2 Tagen geerntet. Die RNA beider Zelllinien wurde isoliert, DNase- verdaut und in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Böttger (Max-Planck-Institut (MPI) in Bad Nauheim) ein *Affymetrix human ST 1.0 S Array* durchgeführt. Die relative Expressionsänderung nach CTCF-Induktion bzw. hBORIS-Überexpression wurde durch Normalisierung auf die jeweilige Negativkontrolle ermittelt. In den Tortendiagrammen ist die Anzahl der Gene dargestellt, die nach CTCF-Induktion bzw. hBORIS-Überexpression eine relative Änderung (um mind. Faktor 0,3) zeigen. Ebenfalls aufgeführt sind die Expressionsänderungen der Gene, die in vorangegangene Expressionsanalysen bereits einbezogen wurden, wobei die Farbkodierung den Originaldaten entspricht.

Bezüglich der bereits in vorangegangenen Experimenten analysierten Gene ist zu vermerken, dass für *DUSP2* eine Reexpression um den Faktor 1,47 zu beobachten ist (Abb.4-32a), was sich mit den zuvor generierten Expressionsdaten deckt (Punkt 4.4.5, Abb. 4-17b). Die *AATK*-Expression wird nach CTCF-Induktion gemäß den *Array*-Daten nicht verändert, wobei im vorangegangenen Experiment die *AATK*-Expression leicht reduziert wurde (Punkt 4.4.5, Abb. 4-17b). *TET1-3* weisen im *Array* keine großen Änderungen auf. Dies deckt sich abgesehen von *TET1* ebenfalls mit den mittels qRT-PCR generierten Daten. Für *TET1* war die in der qRT-PCR beobachtete Abnahme der RNA-Expression nach CTCF-Induktion deutlich stärker (Punkt 4.6., Abb. 4-28). Auch für *RASSF5* zeigen die *Array*-Daten keine starken Veränderungen an.

Tabelle 4-3: Auflistung von Genen, die nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen die stärksten relativen Expressionsänderungen aufweisen

x-fache Expressionsänderung nach chCTCF-Induktion	Gen	vollständiger Genname
12,43255711	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
7,46612215	CGA	glycoprotein hormones, alpha polypeptide
3,756855011	ST8SIA6	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6
3,74322237	ANXA1	annexin A1
3,672373533	ACTBL2	actin, beta-like 2
3,523709059	DNAH17	dynein, axonemal, heavy chain 17
3,377944231	B4GALNT1	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1
3,254407644	NMNAT2	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2
3,228023291	UGT3A2	UDP glycosyltransferase 3 family, polypeptide A2
3,212256432	ACADL	acyl-CoA dehydrogenase, long chain
2,924924612	SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1
2,876694679	MRAS	muscle RAS oncogene homolog
2,811732531	TM6SF1	transmembrane 6 superfamily member 1
2,787050724	MMP2	matrix metalloproteinase 2
2,782320738	UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7
2,764361143	GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1
2,710498333	SPARCL1	SPARC-like 1 (hevin)
2,701427698	ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
2,680590153	USP17L2	ubiquitin specific peptidase 17-like 2
2,467010736	RASSF2	Ras association domain family 2
0,379145861	TBK1	TANK-binding kinase 1
0,378860503	KIF15	kinesin family member 15
0,375475347	MARC1	mitochondrial amidoxime reducing component 1
0,373110265	TRNAQ51P	transfer RNA glutamine 51 (anticodon CUG) pseudogene
0,372965515	GXYLT2	glucoside xylosyltransferase 2
0,371615291	MGAT4A	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N- acetylglucosaminyltransferase, isozyme A
0,36967358	FABP5	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
0,355460227	GAS5	growth arrest-specific 5 (non-protein coding)
0,354385674	LIN7C	lin-7 homolog C (C. elegans)
0,353332013	FRA10AC1	fragile site, folic acid type, rare, fra(10)(q23.3) or fra(10)(q24.2) candidate 1
0,352117121	SUMF2	sulfatase modifying factor 2
0,347724259	SNORD81	small nucleolar RNA, C
0,338298351	PSMD5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5
0,336980492	TMBIM4	transmembrane BAX inhibitor motif containing 4
0,33521834	RN5S85	RNA, 5S ribosomal 85

Die CTCF-Expression wurde in TREx293-chCTCF-Zellen durch Tetrazyklin über 48 h induziert. Als Negativkontrolle wurden uninduzierte Zellen mitgeführt. Die RNA wurde isoliert, DNase- verdaut und in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Böttger (Max-Planck-Institut (MPI) in Bad Nauheim) ein *Affymetrix human ST 1.0 S Array* durchgeführt. Die relative Expressionsänderung nach CTCF-Induktion wurde durch Normalisierung auf die uninduzierte Kontrolle ermittelt. Aufgeführt sind beispielhaft die Gene, die die stärkste Hoch- oder Herunterregulation nach CTCF-Induktion zeigen.

Die genomweiten Veränderungen nach transientser hBORIS-Überexpression in HEK-Zellen wurden ebenfalls mit Hilfe des *Affymetrix human ST 1.0 S Array* ermittelt. Eine Änderung der

RNA-Expression nach BORIS-Überexpression kann bei 5,5% aller analysierten Gene festgestellt werden, wovon 1,5% eine Herunterregulation und 4% eine Hochregulation der RNA-Expression aufzeigen (Abb. 4-32b). Die Mehrheit (94,5%), der im *Array* enthaltenen Gene, blieb von der BORIS-Überexpression unbeeinflusst. In Tabelle 4-4 sind beispielhaft die Gene mit den größten Expressionsänderungen aufgeführt. Die RNA-Expression von *DUSP2* und *AATK* wurde durch BORIS- Überexpression nicht stark verändert. Dies konnte bereits im Rahmen der Expressionsanalysen im Vorfeld gezeigt werden (Punkt 4.5, Abb. 4-27c).

Tabelle 4-4: Auflistung von Genen, die nach hBORIS-Überexpression in HEK-Zellen die größten relativen Expressionsänderungen aufweisen

x-fache Expressionsänderung nach hBORIS-Überexpression	Gen	vollständiger Genname
140,4263916	CTCFL	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like
6,345214844	HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')
3,868615866	SNORD14E	small nucleolar RNA,
2,979517937	TRNAY17P	transfer RNA tyrosine 17 (anticodon GUA) pseudogene
2,866021872	AK5	adenylate kinase 5
2,811752081	ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
2,705957413	HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')
2,585700989	KCNA2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2
2,540537596	SNORD14D	small nucleolar RNA, C
2,53472352	OSTN	osteocrin
2,482172728	SAT1	spermidine
2,467778921	ST8SIA6	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6
2,423423767	LMO3	LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)
2,423033714	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2
2,312692881	DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1
2,312260389	CD24	CD24 molecule
2,269962788	SUSD4	sushi domain containing 4
2,22922945	FAM46C	family with sequence similarity 46, member C
2,175316572	PLXNC1	plexin C1
2,154171944	FRG2	FSHD region gene 2
2,150878668	SNHG1	small nucleolar RNA host gene 1 (non-protein coding)
2,145752668	EDNRB	endothelin receptor type B
0,49039951	OR4M2	olfactory receptor, family 4, subfamily M, member 2
0,487216234	TPH1	tryptophan hydroxylase 1
0,48582679	IQCA1P1	IQ motif containing with AAA domain 1 pseudogene 1
0,484192103	ALS2CR12	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 12
0,482902348	PIH1D2	PIH1 domain containing 2
0,48185724	DNAH6	dynein, axonemal, heavy chain 6
0,481606156	ENAM	enamelin
0,475229651	CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19
0,471009135	TRNAA46P	transfer RNA alanine 46 (anticodon UGC) pseudogene
0,463319868	ARRDC3	arrestin domain containing 3

0,457087278	CYP2C18	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18
0,455568016	TMEM232	transmembrane protein 232
0,406992048	OR2B6	olfactory receptor, family 2, subfamily B, member 6

HEK-Zellen wurden mit pcDNA3-hBORIS oder dem zugehörigen Leervektor transient transfiziert und nach 2 Tagen geerntet. Die RNA wurde isoliert, DNase- verdaut und in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Böttger (Max-Planck-Institut (MPI) in Bad Nauheim) ein *Affymetrix human ST 1.0 S Array* durchgeführt. Die relative Expressionsänderung nach hBORIS-Überexpression wurde durch Normalisierung auf die Leervektor-Kontrolle ermittelt. Aufgeführt sind beispielhaft die Gene, die die stärkste Hoch- oder Herunterregulation nach hBORIS-Überexpression zeigen.

4.7.3 Zusammenfassung der genomweiten Methylierungs-und Expressionsanalysen

Zusammenfassend betrachtet, resultiert die Induktion von CTCF in TREx293-chCTCF-Zellen genomweit nicht in großen Veränderungen hinsichtlich der Gesamt- und Hydroxymethylierung sowie der RNA-Expression. Gleiches gilt für die genomweite RNA-Expression nach transients Überexpression von hBORIS in HEK-Zellen. Dennoch konnten mit Hilfe des *Affymetrix human ST1.0S*- und des Illumina 450K *bead chip*-Arrays neue Gene ermittelt werden, die nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen eine erhöhte Expression mit gleichzeitig reduziertem 5hmC-Level aufweisen sowie CTCF-Bindestellen besitzen, tumorassoziiert sind und zum größten Teil über eine CpG-Insel-Promotormethylierung verfügen (Tab. 4-5). Diese Merkmale machen sie zu exzellenten neuen tumorassoziierten Kandidatengenen, möglicherweise auch Tumorsuppressorgenen, die epigenetisch über CTCF-reguliert werden. Darunter finden sich mit *DUSP8* und *DUSP10* weitere Mitglieder der *DUSP*-Familie. Auch das Tumorsuppressorgen *RASSF2*, als weiteres Mitglied der *RASSF*-Familie, ist ebenso vertreten, wie die Tumorsuppressorgene *CDH1* und *TP53INP1*. Weitere Kandidaten sind Tabelle 4-5 zu entnehmen.

Tabelle 4-5: CTCF-induzierte tumorassoziierte Gene in TREx293-chCTCF-Zellen

Gen	x-fache Expressionsänderung nach CTCF-Induktion	Lage der CTCF-Bindestelle	CpG-Insel-Promotor-hypermethylierung	5hmC Reduktion nach CTCF-Induktion
<i>CDH1</i>	1,5	intragenisch	HeLa	0,81 (cg08051386)
<i>CDKN2C (p18)</i>	1,4	Promotor	U87	0,72 (cg00908631)
<i>CDKN2D (p19)</i>	1,5	Promotor	n.a.	0,79 (cg05338317)
<i>DUSP10</i>	1,5	Promotor	K562	0,53 (cg13442201)
<i>DUSP2</i>	1,5	Promotor	HEK293, H322, MCF7	0,34 (cg05732530)
<i>DUSP8</i>	1,7	intragenisch	HeLa	0,38 (cg20105848)
<i>DKK1</i>	1,5	Promotor	HeLa, U87, T47D	n.a.
<i>HIPK4</i>	1,5	Promotor	HEK293, HeLa	0,71 (cg21278723)
<i>RASSF2</i>	2,5	intragenisch	HeLa	0,80 (cg16818740)
<i>SOCS3</i>	1,4	Promotor	MCF7	0,76 (cg27637521)
<i>TP53INP1</i>	1,6	intragenisch	HEK293, HeLa	0,78 (cg16049864)
<i>TP53TG3</i>	1,5	n.a.	n.a.	n.a.
<i>TP63</i>	1,4	intragenisch	kein CpG-Insel-Promotor	0,76 (cg16764781)

Die aufgeführten Gene weisen im *Affymetrix human ST1.0S* Array eine erhöhte RNA-Expression sowie eine, mittels Illumina 450K *bead chip* detektierte, 5hmC-Reduktion nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen auf. Weiterhin aufgeführt, ist die jeweilige Lage bekannter CTCF-Bindestellen sowie die Zelllinien, in denen eine CpG-Insel-Promotorhypermethylierung bekannt ist, basierend auf UCSC *Genome Browser* Daten.

4.8 Verifikation ausgewählter Ergebnisse des *Affymetrix human ST1.0S* Arrays

Mit Hilfe des *Affymetrix human ST1.0S*- und des Illumina 450K *bead chip*-Arrays konnten wie unter Punkt 4.7 beschrieben weitere tumorassoziierte Kandidatengene identifiziert werden,

die möglicherweise epigenetisch über CTCF reguliert werden. Darunter finden sich u.a. *RASSF2*, *DUSP8* und *DUSP10*. Es wurde damit begonnen, die Ergebnisse des *Affimetrix human ST1.0S-Arrays* zu verifizieren. Dazu wurde die Expressionsveränderung der zuvor genannten Gene mittels qRT-PCR nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen bestimmt. Für alle drei Gene kann jeweils eine Reexpression nach CTCF-Induktion (Abb. 4-33a) beobachtet werden (Abb. 4-33b), wobei die Expression von *RASSF2* und *DUSP8* um etwa das Dreifache gesteigert wird, während die Zunahme der *DUSP10*-Expression 38% beträgt.

Als inverses Experiment wurde ein hCTCF-*Knockdown* durchgeführt. Dieser bewirkt, dass die RNA-Expression von *RASSF2* um 65% reduziert wird (Abb. 4-33c). Die RNA-Expression von *DUSP10* wird ebenfalls verringert, allerdings nur schwach um 20%. Die *DUSP8*-RNA-Expression hingegen wird nach CTCF-*Knockdown* um 70% gesteigert.

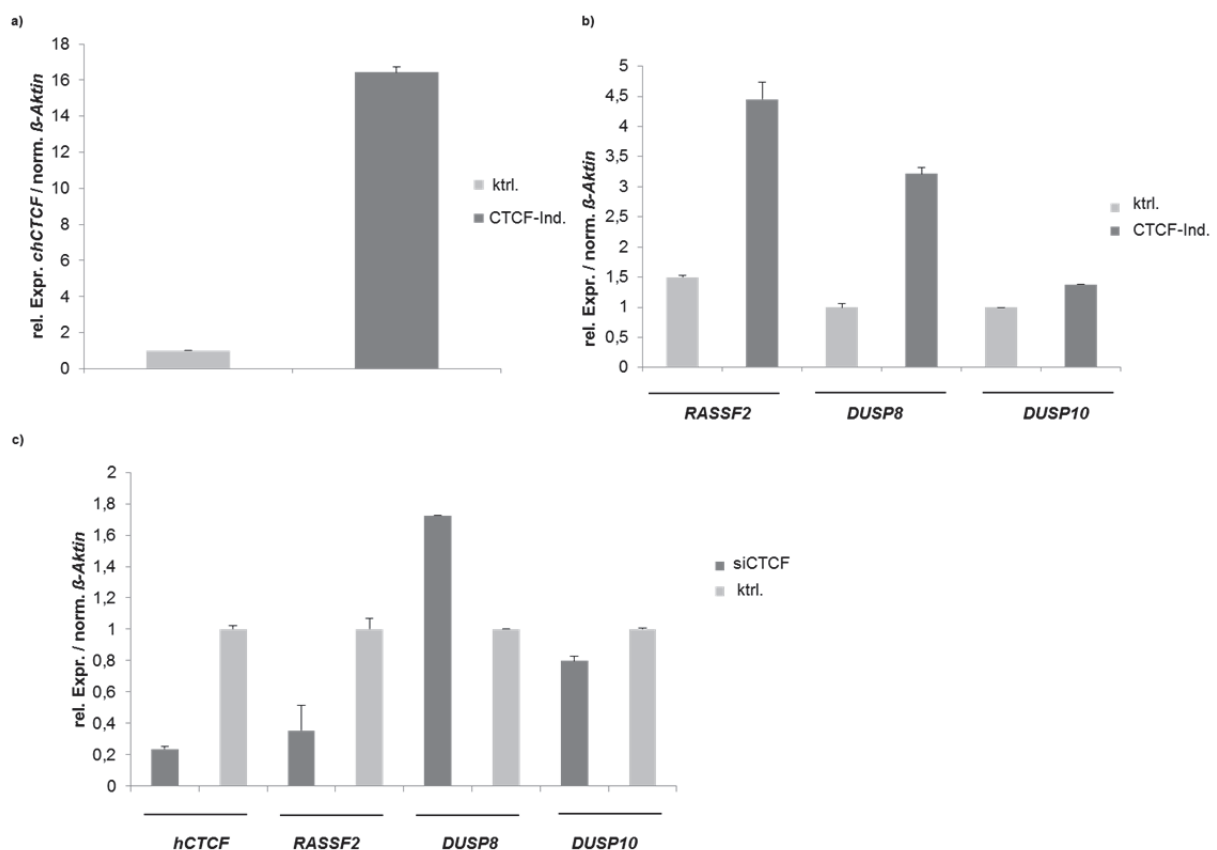


Abbildung 4-33: Einfluss von CTCF auf *RASSF2*, *DUSP8* und *DUSP10*. a-b) In TREx293-chCTCF-Zellen wurde die CTCF-Expression durch Tetrazyklin induziert (CTCF-Ind.); uninduzierte Zellen (ktrl.) wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach 48 h folgte die RNA-Isolation. c) HEK-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einem Mix aus fünf unterschiedlichen siRNAs gegen hCTCF bzw. einer Kontroll-siRNA (ktrl.) transfiziert. Nach 96 h folgte die RNA-Isolation. Die RNA wurde jeweils mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Der Einfluss der CTCF-Induktion bzw. des CTCF-*Knockdowns* auf die RNA-Expression von *RASSF2*, *DUSP8* und *DUSP10* wurde mittels quantitativer RT-PCR erfasst, wobei die spezifische Genexpression auf β -Aktin normalisiert und die Werte der uninduzierten Kontrolle bzw. der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen gleich eins gesetzt wurden. Für jede qRT-PCR wurden Triplikate bestimmt.

Zusammenfassend betrachtet, konnte die mittels *Microarray* erfasste Expressionssteigerung von *RASSF2*, *DUSP8* und *DUSP10* infolge der CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen verifiziert werden. Die Depletion von CTCF führte nur bei *RASSF2* und *DUSP10* zum gegenteiligen Effekt, d.h. zur Reduktion der RNA-Expression.

5 DISKUSSION

Der multifunktionale Transkriptionsfaktor CTCF steht, Hinweisen in der Literatur zu Folge, in Verdacht aufgrund von Fehlregulation in die epigenetische Stilllegung von Tumorsuppressorgenen (TSGs) involviert zu sein, was wiederum zur Karzinogenese beitragen kann (Méndez-Catalá *et al.*, 2013; De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007; Witcher & Emerson, 2009; Soto-Reyes & Recillas-Targa, 2010; Filippova *et al.*, 2002). Die Depletion von CTCF mittels *Knockdown* in HeLa-Zellen führt zur Deregulation zahlreicher Gene (Wendt *et al.*, 2008), darunter auch TSGs bzw. tumorassoziierte Gene, die möglicherweise tumorsuppressive Eigenschaften besitzen. Um die These zu bekräftigen, dass eine Fehlregulation bzw. die Abwesenheit von CTCF die Inaktivierung von TSGs oder putativen TSGs begünstigt oder auslöst, wurden aus den Daten des CTCF-*Knockdowns* von Wendt *et al.*, 2008 die Gene *AATK* und *DUSP2* ausgewählt und hinsichtlich des Einflusses von CTCF analysiert. Kriterien für die Auswahl waren eine signifikante Herunterregulation der RNA-Expression nach CTCF-*Knockdown*, die Vorlage von CTCF-Bindestellen sowie Befunde aus der Literatur, dass diese Gene tumorassoziiert sind bzw. tumorsuppressive Eigenschaften aufweisen. Da sich unter den RASSF-Familienmitgliedern auch TSGs finden (u.a. Dammann *et al.*, 2005; van der Weyden & Adams, 2007), wurden auch diese in die Analyse mit einbezogen. Bevor Untersuchungen durchgeführt wurden, mit denen der Einfluss von CTCF auf die Kandidatengene erfasst werden konnte, erfolgte die Charakterisierung der Kandidaten hinsichtlich Promotormethylierungsstatus, Korrelation zwischen Promotormethylierung und RNA-Expression sowie tumorsuppressiver Eigenschaft.

5.1 Hypermethylierung von *AATK*, *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* in humanen Krebszelllinien und Primärtumoren sowie tumorsuppressive Eigenschaft von *AATK*

Der Promotor des Gens *AATK* stellt einen CpG-Insel-Promotor dar. Im Rahmen der Methylierungsanalyse wurden zwei unterschiedliche Promotorregionen betrachtet: eine am 5'-Rande der CpG-Insel und eine hinter dem Transkriptionsstart (TS) gelegene (Abb. 4-1). Für die, innerhalb der CpG-Insel, aber bereits hinter dem TS befindliche Region konnte eine tumorspezifische Hypermethylierung in diversen epithelialen Tumorentitäten detektiert werden (Abb. 4-2). Der Unterschied zwischen den mittels COBRA und Pyrosequenzierung erhaltenen Daten ist damit zu erklären, dass die beiden Techniken nicht die gleichen Stellen erfassen. Die COBRA klärt lediglich den Methylierungsstatus des innerhalb der *TaqI*-Schnittstelle gelegenen CpGs, während mittels Pyrosequenzierung die drei nachfolgenden CpGs analysiert wurden. Insgesamt korrelieren die Daten der beiden Techniken. Unterschiede sind beispielsweise dahingehend zu finden, dass die Lungenkrebszelllinien H322 und HTB171 in der Pyrosequenzierung sehr hohe Werte zwischen 80% und 90% und damit eine fast vollständige Methylierung aufwiesen, während die Fragmentation in der COBRA eine partielle Methylierung anzeigte. Allgemein ist davon auszugehen, dass innerhalb einer CpG-Insel der Methylierungsstatus einzelner CpGs relativ ähnlich ist. Für die Region innerhalb des *AATK*-Promotors, aber am Rande der CpG-Insel, konnten Methylierungen in allen analysierten Krebszelllinien festgehalten werden, allerdings waren

diese nicht tumorspezifisch, da auch die nicht tumorösen Kontrollen eine Methylierung aufwiesen (Abb.4-2, Tab. 4-1). Dieses nicht tumorspezifische Muster weist darauf hin, dass der analysierte Bereich nicht mehr in der CpG-Insel im Promotorbereich liegt. Außerhalb von CpG-Insel-Promotorregionen finden sich in normalen Zellen weniger, dafür aber häufig methylierte CpGs. Literaturbefunden zu Folge ist die *AATK*-Expression in Adenokarzinomen des Darms vermindert (Lee *et al.*, 2006). In Darmpolypen konnte zudem ein reduziertes *AATK*-Proteinlevel nachgewiesen werden, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht aufgedeckt wurde (Lee *et al.*, 2006). Eine Hypermethylierung der *AATK*-Promotorregion als Ursache wäre denkbar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mangels Probenmaterial keine Kolonkarzinome analysiert werden. Eine Methylierung von *AATK* wurde in serösen ovarialen Neoplasmen beschrieben (Shih *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Spektrum der Tumorentitäten, in denen eine *AATK*-Promotorhypermethylierung vorliegt, erweitert werden. Wie bereits erwähnt, lag eine *AATK*-Promotorhypermethylierung in diversen epithelialen Tumorentitäten vor, darunter Lungen-, Brust-, Haut-, Zervix-, Larynx- und Pankreaskrebszelllinien (Abb. 4-2). Unter Verwendung der demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) konnte zudem eine Demethylierung der *AATK*-Promotorregion u.a. in den nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinien H322 und A549 mit nachfolgender *AATK*-Reexpression erreicht werden (Abb. 4-8). Dies suggeriert, dass die Herunterregulation der *AATK*-RNA-Expression durch Promotorhypermethylierung bedingt ist.

Auch in primären Tumoren konnte eine *AATK*-Promotor-Hypermethylierung erfasst werden (Abb. 4-7, Tab. 4-2). 40% der analysierten primären Lungentumore lagen methyliert vor, wobei die Adenokarzinome häufiger methyliert waren als die Plattenepithelkarzinome. Die analysierten Mammakarzinome waren zu 53% in der *AATK*-Promotorregion methyliert (Tab. 4-2). Im korrespondierenden gesunden Brustgewebe lag allerdings in 4/24 Proben auch eine Methylierung vor, die aber verglichen mit den Tumorproben deutlich schwächer ausfiel. Es gilt zu beachten, dass die Tumorproben zusammen mit vermeintlich gesundem Brustgewebe jeweils aus einer Patientin entnommen wurden. Möglicherweise besaßen die histologisch unauffälligen Gewebeproben bereits epigenetische Veränderungen. Bekräftigt wird diese Vermutung damit, dass normales Brustgewebe aus nicht erkrankten Patientinnen keine *AATK*-Promotormethylierung aufwies (Haag *et al.*, eingereicht).

Die zuvor aufgeführten Befunde führen zu der Überlegung, ob die *AATK*-Methylierung einen neuen Biomarker für prognostische und diagnostische Zwecke in der humanen Krebsforschung darstellen könnte. Deletionen der chromosomalen Region, die das *AATK*-Gen beinhaltet, wurden in unterschiedlichen Tumorentitäten, einschließlich Mamma-, Zervix- und Oraltumoren beobachtet (Saito *et al.*, 1993; Viswanathan *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2008). Da im Allgemeinen beide Allele eines TSGs inaktiviert sind, weisen die Befunde darauf hin, dass die Deletion sowie epigenetische Inaktivierung zwei Wege darstellen, die zur Inaktivierung von *AATK* in humanen Tumoren führen. Interessant wäre es zu analysieren, ob in der kodierenden oder den regulatorischen *AATK*-Sequenzen SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) vorliegen. SNPs stellen ca. 90% aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar. Zwei Drittel aller SNPs bestehen aus dem Austausch von Cytosin durch Thymin, da Cytosin im Wirbeltier-Genom häufig methyliert wird. Durch spontan auftretende Desaminierung wird aus 5-Methylcytosin Thymin. Je nach Basenaustausch kann die Information des Codons verändert sein. Codiert das Triplett weiterhin für die gleiche Aminosäure, spricht man von einem synonymen SNP. Bei einem nicht-synonymen SNP erfolgte ein Aminosäurewechsel. Liegt ein nicht-synonymer SNP in einer kodierenden Region, kann eine veränderte Base eine Auswirkung auf die Proteinfunktion haben und

physiologische Defekte nach sich ziehen. Eine ebenfalls große Gruppe an SNPs liegen in regulatorischen Regionen und stören die Genregulation, was zur Beeinflussung von Transkription und Proteinkonzentration führt (Bersaglieri *et al.*, 2004).

Bereits bekannt ist, dass AATK die Zellproliferation, Koloniebildung und Migration von Melanomzellen hemmt sowie die Apoptose in diesen Zellen fördert (Ma & Rubin, 2014). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass murines AATK auch das Koloniewachstum in der Lungenkrebszelllinie H322 und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, in denen die AATK-RNA-Expression durch Promotorhypermethylierung vermindert ist, signifikant hemmt (Abb. 4-9). Die Protein-Tyrosin-Kinase-Domäne von humanem und murinem AATK ist zu 92% homolog (Analyse mittels Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)). Dennoch sollte in künftigen Experimenten die tumorsupprimierende Wirkung von humanem AATK verifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit war dies nicht möglich, da ein hAATK-Konstrukt nicht erhalten werden konnte.

AATK wurde als Kinase beschrieben, die die neuronale Differenzierung in einer humanen Neuroblastomzelllinie induziert und fördert (Raghunath *et al.*, 2000). Daher wäre es vorstellbar, dass eine Herunterregulation von AATK mit einer Entdifferenzierung von humanen epithelialen Zelllinien assoziiert ist. Die Entdifferenzierung geht mit einer Funktionsminderung oder einem Funktionsverlust der Zelle einher und stellt ein wichtiges Merkmal für die Malignität von Tumorzellen dar (Knippers, 2006).

Eine AATK-*Knockout*-Maus wurde bereits in einer Arbeitsgruppe etabliert, Literaturdaten hinsichtlich des Phänotyps beschränken sich aber nur auf das Hirn bzw. das Nervensystem (Takano *et al.*, 2012). Der *Knockout* führt im Vergleich zu Wildtypmäusen zu reduzierter Hirngröße, abnormaler Neuriten- und Axonmorphologie (Takano *et al.*, 2012).

Auch für die dual spezifische Phosphatase *DUSP2* konnte eine tumorspezifische Hypermethylierung der Promotorregion in diversen Krebsentitäten erfasst werden; darunter Lungen-, Brust-, Melanom-, Sarkom- und Leberkrebszelllinien (Abb. 4-4). Die mittels COBRA und Pyrosequenzierung detektierten Methylierungen korrelieren. Geringfügige Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Techniken sind, wie auch im Fall von AATK, auf das Erfassen unterschiedlicher CpGs zurückzuführen.

Eine Korrelation zwischen *DUSP2*-Promotorhypermethylierung und reduzierter RNA-Expression konnte mittels Aza-Behandlung für die Lungenkrebszelllinie H322, die Brustkrebszelllinie ZR751 sowie die embryonale Nierenzelllinie HEK beobachtet werden (Abb. 4-8). Des Weiteren konnte mittels Luciferaseassay bestätigt werden, dass eine Methylierung die *DUSP2*-Promotoraktivität hemmt (Abb. 4-22). Da *DUSP2* vorwiegend in hämatopoetischen Geweben mit hohem T-Zell-Gehalt, wie dem Thymus, der Milz und den Lymphknoten exprimiert wird (Rohan *et al.*, 1993, Boschert *et al.*, 1997 und Gum *et al.*, 2003), zielen viele Studien auf die Funktion von *DUSP2* im Immunsystem ab. So beschränkt sich in der Literatur derzeit auch die Charakterisierung des *DUSP2-Knockout*-Maus-Phänotyps auf das Immunsystem. Dieser ist geprägt durch eine abnormale Mastzell-Physiologie, Makrophagen-Aktivierung und Zytokin-Sekretion verglichen mit Wildtypmäusen. Zudem wiesen die *Knockout*-Mäuse eine reduzierte Anfälligkeit gegenüber induzierter Arthritis auf (www.genecards.org). *DUSP2* gerät aber immer mehr in den Focus pathologischer Prozesse bei Krebserkrankungen.

DUSP2 wurde anfänglich als Protein-Tyrosin-Phosphatase beschrieben, die in hämatopoetischem Gewebe massiv exprimiert wird und eine entscheidende Rolle in der Inaktivierung des ERK-Signalweges spielt. So berichteten Studien von einer zunehmenden *DUSP2*-Expression in Folge der ERK-Kaskade-Aktivierung (Rohan *et al.*, 1993, Ward *et al.*,

1994). Es zeigte sich aber auch, dass in humanen, akuten Leukämien eine Herunterregulation von *DUSP2* erfasst wurde, die signifikant mit einer Hyper-Expression der ERK-Aktivierung korrelierte (Kim *et al.*, 1993). Eine signifikante Herunterregulation der *DUSP2* mRNA sowie des Proteins in diversen Krebsentitäten, darunter Brust-, Kolon-, Lungen-, Eierstock-, Nieren- und Prostatakrebs wurde ebenfalls beobachtet (Lin *et al.*, 2011). Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit, in der reduzierte *DUSP2*-RNA-Level ebenfalls in Lungen- und Brustkrebszelllinien erfasst werden konnten (Abb. 4-8). Zudem ist die *DUSP2*-Suppression mittels Hypoxie mit maligner Tumorgenese und erhöhter Chemoresistenz assoziiert (Lin *et al.*, 2011). Dem entgegen steht allerdings die Studie von Givant-Horwitz *et al.*, die in serösen Ovarialkarzinomen erhöhte *DUSP2*-mRNA-Level detektierten, die signifikant mit einer schlechten Krankheitsprognose einhergingen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der *DUSP2*-Promotormethylierungsstatus auch in fünf Ovarialkarzinom-Zelllinien erfasst, wovon vier eine partielle Methylierung aufzeigten (Abb. 4-4, Tab. 4-1). Interessant wäre es, zum Einen die *DUSP2*-Promotormethylierung in Primärtumoren dieser Tumorentität zu erfassen und zum Anderen RNA-Expressionsanalysen durchzuführen, um eine eventuelle Korrelation zwischen Promotorhypermethylierung und RNA-Expression aufzudecken. Anderen Berichten zufolge liegt eine *DUSP2*-Hypermethylierung in Prostatakarzinomen vor (Yu *et al.*, 2005). Sano *et al.* identifizierten *DUSP2* in einem Vorhersage-Modell für die individuelle Antwort auf eine Epirubicin / Cyclophosphamid- Kombinations-Chemotherapie als Marker-Gen für Brustkrebs. Befunde von Demircan *et al.* 2009 tendieren ebenfalls in diese Richtung. Sie fanden in murinen und humanen Mammakarzinomzelllinien, dass *DUSP2* durch Promotorhypermethylierung stillgelegt ist, was sich mit den Befunden der vorliegenden Arbeit deckt. Eine Hypermethylierung in humanen, primären Brusttumoren konnte jedoch weder durch Demircan *et al.*, noch durch die vorliegende Arbeit nachgewiesen werden. Dies deutet an, dass die Stilllegung von *DUSP2* ein seltenes und/oder spätes Ereignis in der Karzinogenese von Brusttumoren ist. Auch in anderen Tumorentitäten könnte dies der Fall sein. Beispielsweise konnte in diversen Lungenkrebszelllinien eine *DUSP2*-Promotormethylierung detektiert werden, die für H322 relativ ausgeprägt und für A549 sowie A427 partiell vorlag (Abb. 4-4). In primären Lungentumoren konnte hingegen keine *DUSP2*-Promotormethylierung verbucht werden (Tab. 4-2). Es gilt allerdings anzumerken, dass es sich bei den analysierten Primärtumoren um kleinzellige Lungentumore handelt, während die Zelllinien mit methyliertem *DUSP2*-Promotor nicht-kleinzellige Lungenkrebszelllinien darstellen. HTB171 als einzige kleinzellige Lungenkrebszelllinie wies keine *DUSP2*-Promotormethylierung auf (Abb. 4-4). Die naheliegende Vermutung, dass nur nicht-kleinzellige Lungentumore von einer *DUSP2*-Methylierung betroffen sind, wird damit widerlegt, dass H358, als nicht-kleinzellige Lungenkrebszelllinie, hinsichtlich des *DUSP2*-Promotors unmethyliert ist (Abb. 4-4). Während primäre Lungentumore, Phäochromozytome, d.h. hormonell aktive Tumore des Nebennierenmarks sowie Mammakarzinome keine *DUSP2*-Promotorhypermethylierung aufwiesen (Abb. 4-7, Tab. 4-2), konnte interessanterweise gezeigt werden, dass der *DUSP2*-Promotor vielfach in Merkelzellkarzinomen (MCC) methyliert ist (Abb. 4-7, Tab. 4-2). MCCs sind sehr seltene bösartige, aggressive Hauttumore, die von den Merkel-Zellen der Oberhaut ausgehen (Hodgson, 2005). 45% (10/22) der analysierten MCCs wiesen eine *DUSP2*-Promotormethylierung auf, während nur 8%, d.h. eine von zwölf Normalhautproben bzw. Nävuszellnävi methyliert war. Bei fünf der sechs analysierten Melanomzelllinien konnten ebenfalls *DUSP2*-Promotormethylierungen gefunden werden (Abb. 4-4). Auf Expressionsebene wurden noch keine Analysen durchgeführt, daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine *DUSP2*-

Promotormethylierung mit reduzierter *DUSP2*-RNA-Expression einhergeht. Möglicherweise könnten diese Befunde dazu führen, dass *DUSP2* als Markergen in Hautkrebs speziell des sehr aggressiven und seltenen Merkelzellkarzinoms genutzt werden kann. Denkbar wäre auch, dass die veränderte *DUSP2*-Promotormethylierung mit einer p53-Mutation in MCCs assoziiert ist (Van Gele *et al.*, 2000), da *DUSP2* als Zielgen von p53 beschrieben wurde (Yin *et al.*, 2003).

Da bereits vielfach darüber berichtet wurde, dass *DUSP2* in der Lage ist, das Tumorstadium zu inhibieren und ferner eine *DUSP2*-Überexpression die Anfälligkeit für Apoptose erhöht (Yin *et al.*, 2003), lag der Fokus dieser Arbeit auf der epigenetischen Regulation von *DUSP2*.

Funktionell konnte bereits gezeigt werden, dass *DUSP2* als Zielgen in zwei fundamentalen Signalwegen involviert ist. Zum Einen ist es ein p53 Zielgen, das verantwortlich ist für die p53-vermittelte Apoptose in der Antwort auf oxidativen Stress. p53 aktiviert die Transkription von *DUSP2* durch Bindung an eine palindromische Bindestelle im *DUSP2*-Promotor während der Apoptose (Yin *et al.*, 2003). *DUSP2* fungiert als *downstream* Effektor der p53 Funktion, um die MAPK-Kaskade zu supprimieren und Zellwachstumssuppression sowie Apoptose zu induzieren (Yin *et al.*, 2003). Zum Anderen ist *DUSP2* ein direktes transkriptionelles Ziel von E2F-1 im apoptotischen Signalweg, wobei E2F-1 die Aktivität des Rb (Retinoblastom) Tumorsuppressors vermittelt und eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle durch Transkriptionsregulation der Zielgene spielt (Wu *et al.*, 2007). Des Weiteren supprimiert E2F-1 die ERK-Aktivität über *DUSP2*, um die Sensitivität von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen, was zur Apoptose der Krebszellen führt (Wu *et al.*, 2007). Die beschriebenen Funktionen von *DUSP2* im Apoptosegeschehen von Krebszellen zusammen mit einer möglichen Funktion als Biomarker, könnten eine molekulare Basis für die zukünftige Krebstherapie bilden.

Von *RASSF5* existieren drei unterschiedliche Isoformen (*RASSF5A*, *RASSF5B* und *RASSF5C*), die das Resultat alternativen Splicings und differentiellen Promotorgebrauch sind (Tommasi *et al.*, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isoformen *RASSF5A* und *RASSF5C* werden von zwei separaten CpG-Insel-Promotoren transkribiert (Tommasi *et al.*, 2002). Die Methylierungsdaten beider Isoformen unterscheiden sich deutlich voneinander. Während der *RASSF5A*-Promotor in allen untersuchten Krebszelllinien, abgesehen von der Larynxkarzinomzelllinie Hep2, vollständig oder partiell methyliert war, wies der *RASSF5C*-Promotor nur eine Methylierung in der Lungenkrebszelllinie A427 und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa auf (Abb. 4-6). Die als Kontrollgewebe verwendeten humanen Fibroblasten und die Brustepithelzelllinie HB2 wiesen keine *RASSF5C*-Promotormethylierung auf; bezüglich des *RASSF5A*-Promotors konnten eine sehr schwache Methylierung in humanen Fibroblasten sowie eine partielle Methylierung in HB2 festgestellt werden (Abb. 4-6). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die *RASSF5C*-Promotormethylierung tumorassoziiert ist, während dies für *RASSF5A* nicht vollständig geklärt ist. Es wäre daher notwendig mehr Kontrollgewebe zu betrachten. Auch in Primärtumoren zeigt sich ein ähnliches Bild. Beispielsweise konnten bei 44% der analysierten Merkelzellkarzinome eine *RASSF5A*-Methylierung nachgewiesen werden; allerdings waren auch 43% der benignen Nävuszellnävi methyliert, womit nicht von einer Merkelzell-spezifischen *RASSF5A*-Promotorhypermethylierung ausgegangen werden kann (Abb. 4-7; Tab. 4-2; Richter *et al.*, 2013). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Literaturdaten, die zeigen konnten, dass der *RASSF5A*-Promotor spezifisch in diversen Primärtumoren, darunter Thyroidkarzinome, Neuroblastome und Paragangliome des

Abdomen, hypermethyliert vorliegt (Schagdarsurengin *et al.*, 2010, Hesson *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde berichtet, dass *RASSF5A* in normalem Gewebe exprimiert wird, hingegen in einigen Krebszelllinien herunterreguliert ist (Hesson *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnten keine stark reduzierten *RASSF5A*-RNA-Level in den analysierten Krebszelllinien MCF7, A549, HEK und HeLa erfasst werden, und das trotz zum Teil vollständiger Promotormethylierung (Abb. 4-8a). MCF7 und A549 wiesen leichte Verminderungen der *RASSF5A*-RNA-Expression auf, die nach Aza-Behandlung wieder leicht zunahm. Für HEK und HeLa mit jeweils vollständig methyliertem *RASSF5A*-Promotor konnte keine Reduktion der RNA-Expression festgestellt werden, womit die *RASSF5A*-Promotormethylierung keinen Einfluss auf die RNA-Expression zu scheinen hat. Auch Tommasi *et al.* und Aoyama *et al.* beobachteten eine deutliche *RASSF5A*-RNA-Expression in HeLa-Zellen. Dennoch wurde für *RASSF5A* eine tumorsuppressive Eigenschaft nachgewiesen (Moshnikova *et al.*, 2006). *RASSF5C* wird als Tumorsuppressor-Kandidat beschrieben (Macheiner *et al.*, 2006); diese Eigenschaft konnte aber mittels *Colony Formation Assays* in HeLa- und A427- Zellen mit vollständig methyliertem *RASSF5C*-Promotor nicht bestätigt werden (Abb. 4-9). Eine *RASSF5C*-Reexpression nach Aza-Behandlung konnte nur für die Lungenkrebszelllinie A427 nachgewiesen werden (Abb. 4-8). Epigenetische Stilllegung von *RASSF5C* durch Promotorhypermethylierung wurde bereits in hepatozellulären Karzinomen beobachtet (Macheiner *et al.*, 2006). Die Analyse der *RASSF5C*-Promotormethylierung von Primärtumoren unterschiedlicher Krebsentitäten ergab, dass weder in kleinzelligen Lungenkarzinomen noch in Phäochromozytomen eine Hypermethylierung zu finden ist (Tab. 4-2). Hingegen wiesen 18% der Ovarialkarzinome sowie 7% der Merkelzellkarzinome eine *RASSF5C*-Promotormethylierung auf, während die Kontrollgewebe unmethyliert waren (Abb. 4-7, Tab. 4-2). Inwieweit diese Ergebnisse funktionell relevant sind, muss durch weitere Untersuchungen in diesen Krebsentitäten bestimmt werden. Das Phänomen, dass zwei unterschiedliche *RASSF*-Transkripte, die von zwei verschiedenen CpG-Insel-Promotoren transkribiert werden, ein gegensätzliches Verhalten hinsichtlich Methylierung und Expression zeigen, konnte auch bei *RASSF1* beobachtet werden (Dammann *et al.*, 2000). Während der *RASSF1A*-Promotor häufig in Tumoren hypermethyliert ist, trifft dies für *RASSF1C* nicht zu (Dammann *et al.*, 2000).

5.2 CTCF führt methylierungsabhängig zur Reexpression von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C*

Der Faktor CTCF ist bekannt für seine vielfältigen Funktionen in der Genregulation. In Abhängigkeit des beteiligten genetischen Locus ist er in die transkriptionelle Aktivierung (Vostrov & Quitschke, 1997, Engel *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2009) ebenso involviert, wie in die transkriptionelle Repression (Lobanenkov *et al.*, 1990, Renaud *et al.*, 2005) oder Enhancer-Blockade (Bell *et al.*, 1990). Des Weiteren wurde CTCF als bedeutender Chromatinfaktor mit veränderter Expression tumorassoziierter Gene, wie beispielsweise E-Cadherin, Retinoblastom und p16, in Verbindung gebracht (Witcher & Emerson, 2009; Davalos-Salas *et al.*, 2011). Postuliert wird auch, dass CTCF selbst als Tumorsuppressor wirkt (Fiorentino & Giordano *et al.*, 2012; Tiffen *et al.*, 2013).

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass CTCF die RNA-Reexpression von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* in Zelllinien mit stark oder vollständig methyliertem Promotor bewirkt (Abb. 4-10; 4-11), während bei Vorlage eines unmethylierten Promotors keine

Expressionsänderung festgestellt wurde. Für weitere RASSF-Familienmitglieder wie *RASSF5A*, *RASSF2* und *RASSF10* konnte dies nicht beobachtet werden (Abb. 4-10). Ähnlich wie hinsichtlich des Vorhandenseins von Promotormethylierung unterscheiden sich die beiden *RASSF5*-Isoformen *RASSF5A* und *RASSF5C* deutlich voneinander. In der embryonalen Nierenzelllinie HEK mit partiell methyliertem *AATK* und *DUSP2*-Promotor sowie den tetrazyklin induzierbaren TREx-chCTCF-Zellen konnte ebenfalls eine durch CTCF herbeigeführte gesteigerte *DUSP2*-RNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4-11, 4-17), diese ist jedoch geringer als in der Lungenkrebszelllinie H322, in der ein stark methylierter *DUSP2*-Promotor vorliegt. Dies lässt zusammen mit der Beobachtung, dass die RNA-Expression in Zelllinien mit jeweils unmethyliertem *DUSP2*-Promotor nach CTCF-Überexpression nicht verändert wird, auf eine methylierungsabhängige Reexpression nach CTCF-Überexpression bzw. Induktion schließen. Die *AATK*-RNA-Expression hingegen wurde in diesen Zelllinien nicht verstärkt (Abb. 4-11, 4-17). CTCF-*Knockdown* mittels siRNA in Zelllinien mit partiell methyliertem oder unmethyliertem *AATK*, *DUSP2* oder *RASSF5C*-Promotor führte zu reduzierter RNA-Expression der zuvor genannten Gene (Abb. 4-16). Auch Barski und Wendt *et al.* konnten in einem genomweiten RNA-Screen nach CTCF-*Knockdown* in HeLa-Zellen mit unmethyliertem *DUSP2*- und partiell methyliertem *AATK*-Promotor eine Reduktion der *DUSP2*- und *AATK*- RNA-Expression feststellen.

Überexpression einzelner CTCF-Domänen in Zelllinien mit stark methyliertem *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C*-Promotor ergaben, dass der CTCF-N-Terminus allein in der Lage ist, die *DUSP2*- oder *RASSF5C* RNA-Reexpression zu bewerkstelligen, da nach Überexpression dieser Domäne ähnliche *DUSP2*- und *RASSF5C*-RNA-Level, wie nach der Überexpression des CTCF *full length*-Konstrukts nachgewiesen werden konnten (Abb. 4-11). Alleinige Überexpression des N-Terminus konnte die nach *full length* CTCF erreichte *AATK*-RNA-Expression nicht vollständig wiederherstellen (Abb. 4-11). Der C-Terminus und die Zinkfingerdomäne von CTCF können die Reexpression von *DUSP2*, *AATK* und *RASSF5C* nur partiell induzieren, da für *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* nach Überexpression dieser Domänen die RNA-Expression aller drei Gene im Vergleich zum *full length* Konstrukt deutlich verringert war (Abb. 4-11; Abb. 6-3 Anhang).

Der CTCF-N-Terminus beinhaltet eine SUMOylierungs- sowie eine PARYlierungsstelle. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine korrekte PARYlierung notwendig für eine optimale CTCF-Funktion hinsichtlich transkriptioneller Aktivierung des p19ARF Promotors und Inhibition der Zellproliferation ist (Farrar *et al.*, 2010). In dem von Farrar *et al.* vorgeschlagenen Model erfolgt die Regulation von CTCF über die PARYlierung, wobei CTCF und Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) funktionelle Komplexe bilden. Weiterhin ist bekannt, dass die epigenetische Stilllegung des Tumorsuppressors p16^{INK4a} mit dem Verlust der CTCF-Bindung und einem Chromatin-*Boundary* einhergeht, wobei ebenfalls fehlerhafte PARYlierung und Dissoziation vom molekularen Chaperon Nucleolin eine Rolle spielen (Witcher & Emerson, 2009). Bei den, für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten, resultierte die Überexpression des CTCF-Konstruktes mit fehlender PARYlierungsstelle im N-Terminus in einer deutlichen Repression der *DUSP2*- und *AATK*-RNA-Expression in H322-Zellen mit stark methyliertem *DUSP2*- und *AATK*-Promotor (Abb. 4-11), was andeutet, dass fehlende PARYlierung die Reexpression verhindert. Diese Beobachtung passt zu den zuvor genannten Literaturbefunden. In HEK-Zellen mit partiell methyliertem *DUSP2*- und *AATK*-Promotor konnte dieser Effekt für *DUSP2* schwächer, für *AATK* hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 4-11). Die Deletion der PARYlierungsstelle hatte auf die RNA-Expression von *RASSF5C* keinen Effekt (Abb. 4-11). Allerdings liegen diesbezüglich nur qualitative RT-PCR-Daten vor, die schwächere Effekte nicht detektieren

bzw. durch optische Normalisierung auf β -Aktin möglicherweise verdecken. Weiterführende Analysen, bei denen die PARYlierung durch Überexpression der Poly-(ADP-Ribose) Glykohydrolase (PARG) oder Einsatz des Inhibitors 3-Aminobenzamid (ABA) unterdrückt wurde, konnten die Repression der *DUSP2* oder *AATK*-RNA-Expression nicht bestätigen (Abb. 4-12). Allerdings wurden lediglich HeLa- und HEK-Zellen, nicht aber H322-Zellen, in denen die Repression nach Überexpression des Deletionskonstruktes vorlag, untersucht. Denkbar wäre auch, dass die Deletion der PARYlierungsstelle einen zu großen Bereich umfasst (80 bp), in dem beispielsweise weitere Bindestellen liegen, die für die korrekte CTCF-Funktion und Bindung von Co-Faktoren essentiell sind.

Des Weiteren beinhaltet die N-terminale CTCF-Domäne eine SUMOylierungsstelle. Diese Modifikation wurde mit der reprimierenden Funktion von CTCF in der *c-myc*-Expression in Zusammenhang gebracht (Mac Pherson *et al.*, 2009). Ebenfalls wird berichtet, dass die CTCF-SUMOylierung eine CTCF-Domäne moduliert, die die Transkription aktiviert und Chromatin dekondensiert (Kitchen & Schoenherr, 2010). Dies führte zur Hypothese, dass CTCF als ein tumorrelevanter Faktor agiert, der tumorassoziierte Gene wie *DUSP2* und *AATK* induziert. Die Daten meiner Arbeit unterstützen diese Hypothese. Überexpression des CTCF-Konstruktes mit mutierter SUMOylierungsstelle im CTCF-N-Terminus führte zu deutlich reduzierter *DUSP2*- und *AATK*-RNA-Expression in der Lungenkrebszelllinie H322 verglichen mit Überexpression des *full length*-Konstruktes oder der alleinigen N-terminalen CTCF-Domäne (Abb. 4-11). Die Überexpression von SUMO 2 und SUMO 3 bzw. die Kombination aus SUMO1-3 hingegen resultierte in einer gesteigerten *DUSP2*-Expression (Abb. 4-13). Die Kombination aus SUMO 1-3- und CTCF-Überexpression führte allerdings nicht zu einem synergistischen Effekt (Abb. 4-13). Für *RASSF5C* konnten wie auch nach Überexpression des CTCF-Konstruktes mit deletierter CTCF-PARYlierungsstelle keine Expressionsänderungen mittels qualitativer RT-PCR erfasst werden (Abb. 4-11). Dabei gilt es zu beachten, dass die Experimente nur in HeLa-Zellen durchgeführt wurden. HeLa-Zellen werden bereits seit mehreren Jahrzehnten kultiviert, womit davon ausgegangen werden kann, dass sie keinen normalen Karyotyp mehr besitzen und vermutlich eine Vielzahl an Mutationen innerhalb des Genoms aufweisen. HeLa- und A427-Zellen waren aber die einzigen Zellen mit methyliertem *RASSF5C*-Promotor und es war trotz Einsatz einer Vielzahl von Transfektionsreagenzien nicht möglich in A427-Zellen eine vertretbar hohe Transfektionseffizienz zu erlangen, was einen Einsatz in den Überexpressionsexperimenten nicht möglich machte.

5.3 Keine Bestätigung der aktivierenden Wirkung von CTCF auf den *DUSP2*-Promotor mittels Luciferaseassay

Eine direkte aktivierende Wirkung von CTCF auf den *DUSP2*-Promotor konnte mittels Luciferaseassay nicht bestätigt werden (Abb. 4-22). Die Ergebnisse dieser Analysen stehen in Kontrast zu den Expressionsdaten, da hier der Eindruck vermittelt wird, dass CTCF die *DUSP2*-Promotoraktivität reprimiert. Denkbar wäre, dass die Nutzung des zirkulären *DUSP2*-Promotorkonstrukts nicht optimal war und die Wirkung auf ein linearisiertes Plasmid womöglich ein anderes Ergebnis erzielt hätte. Ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass dem Promotorkonstrukt bestimmte Bindestellen fehlen, die im Zellsystem vorhanden sind und der Effekt der CTCF-Überexpression damit nicht zustande kommt. Das Fehlen der CTCF-Bindestellen führt zu gehemmter *DUSP2*-Promotoraktivität, allerdings nicht zum kompletten

Funktionsverlust (Abb. 4-22). Für die Regulation von *DUSP2* durch CTCF könnte die chromosomale Konfiguration und die intakte genomische Lokalisation von maßgeblicher Bedeutung sein.

5.4 Methylierungsabhängige Bindung von CTCF an den *DUSP2*-, *AATK*- und *RASSF5C*-Promotor

Vielfach wurde berichtet, dass CTCF im Gegensatz zu seinem Paralog BORIS nicht an die methylierte Konsensussequenz binden kann (Nguyen *et al.*, 2008) bzw. CpG-Methylierungen an CTCF-Bindestellen eine CTCF-Bindung verhindern (z.B. IGF2/H19). Ebenfalls gibt es Daten, die zeigen, dass CTCF gebundene DNA unmethyliert bleibt und Ausbreitungen von CpG-Methylierungen durch CTCF-Bindung unterbunden werden, womit nahegelegene Promotoren vor epigenetischer Stilllegung durch Methylierung geschützt sind (Filipova, 2008). Dennoch konnte beobachtet werden, dass nach CTCF-Überexpression bzw. CTCF-Induktion in Zellen mit methylierter *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C*-Promotorregion eine Reexpression der *AATK*-, *DUSP2*- oder *RASSF5C*-RNA erfolgt (Abb. 4-10, 4-11, 4-17). Auch die Analysen der CTCF-Bindung an die Promotoren von *AATK*, *DUSP2* und *RASSF5C* mittels ChIP bestätigen eine methylierungsabhängige CTCF-Bindung (Abb. 4-18 bis 4-20). Vorhandene ChIP-Seq-Daten (Abb. 4-18) weisen jedoch darauf hin, dass eine CTCF-Bindung auch an partiell methylierten Promotor-Regionen möglich ist. Zudem gibt es Befunde, dass CTCF-Bindestellen eine durchschnittliche Methylierung von 20% aufweisen, mit zunehmender Methylierung in angrenzenden Bereichen (Stadler *et al.*, 2011). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch eine bestehende Methylierung die CTCF-Bindung nicht geblockt wird und in einer lokalen reduzierten Methylierung resultiert (Stadler *et al.*, 2011). Vor allem eine Bindung an pre-methylierte CpG-arme Bindestellen mit anschließender lokaler Demethylierung wurde beobachtet (Stadler *et al.*, 2011). Berichten von Feldmann *et al.* nach, ist CTCF in der Lage an Moleküle mit unterschiedlichen Methylierungsgraden zu binden. Auch die ChIP-Daten dieser Arbeit konnten zeigen, dass CTCF nicht per se durch eine vorhandene Methylierung geblockt wird, da in TREx-chCTCF-Zellen mit partiell methyliertem *DUSP2*-Promotor nach CTCF-Induktion die CTCF-Bindung am *DUSP2*-Promotor verstärkt wird (Abb. 4-19). In der Lungenkrebszelllinie H322 wurde ebenfalls ein Signal für die CTCF-Bindung am *DUSP2*-Promotor erfasst, allerdings auch für die Negativkontrolle (Abb. 4-19). Auch durch mehrmalige Wiederholung des Experimentes konnte keine spezifische CTCF-Bindung festgestellt werden. Öffentlich zugängliche ChIP-Seq-Daten, beispielsweise im UCSC-*Genome Browser*, existieren für diese Lungenkrebszelllinie nicht.

5.5 Schwache Demethylierung des *AATK*- und *DUSP2*-Promotors in Folge einer CTCF-Überexpression

Eine schwache lokale Demethylierung konnte nach CTCF-Überexpression in der Lungenkrebszelllinie H322 mit stark methyliertem *AATK*- und *DUSP2*-Promotor sowohl am *AATK*- als auch am *DUSP2*-Promotor vernommen werden (Abb. 4-14). Die untersuchten Bereiche liegen jeweils innerhalb einer CpG-Insel, allerdings finden sich die CTCF-

Bindestellen in relativ CpG armen Bereichen, was sich mit den Beobachtungen von Stadler *et al.* deckt.

Am *AATK*-Promotor fand sich der stärkste demethylierende Effekt mit einer Abnahme von 8% an CpG2, das in der CTCF-Bindestelle liegt. Eine schwache Demethylierung am *DUSP2*-Promotor wurde nur in der *upstream* Region beobachtet. Eine Demethylierung um 3% betrifft das in der CTCF-Bindestelle gelegene CpG2, die größte Abnahme der Methylierung findet sich allerdings an CpG4 (ca. 10%), das zwischen den beiden CTCF-Bindestellen lokalisiert ist. Interessanterweise ist diese Demethylierung von ca. 10% nach *full length* CTCF-Überexpression, Überexpression des CTCF-C-, N-Terminus sowie des Konstruktes mit mutierter SUMOylierungsstelle im C-Terminus zu beobachten, während das Fehlen der SUMOylierungsstelle sowie die Deletion der PARYlierungsstelle im N-Terminus diesen Effekt verhindern. Dies korreliert mit den Expressionsergebnissen in H322-Zellen (Abb. 4-11), die zeigten, dass Mutation der SUMOylierungsstelle sowie Deletion der PARYlierungsstelle im N-Terminus nicht zur Reexpression von *DUSP2* führen. Verglichen mit der Demethylierung nach Aza-Behandlung (Abb. 4-8, 4-15) sind die aufgezeigten Effekte eher schwach, wobei die Aza-Behandlung (4 Tage) über einen doppelt so langen Zeitraum wie die CTCF-Überexpression (2 Tage) durchgeführt wurde. Nach CTCF-*Knockdown* beschränkte sich eine Methylierungszunahme auf ein einziges CpG und zwar CpG2, das in der CTCF-Bindestelle liegt (Abb. 4-16). An CpG4 hingegen, das nach CTCF-Überexpression eine Demethylierung aufwies, konnte keine Methylierungszunahme nach CTCF-*Knockdown* vernommen werden. Für diesen Versuch wurden die Zelllinien HeLa und HTB171 verwendet, bei denen ein aktiver *DUSP2*-Promotor vorzufinden ist. Interessant wäre es in zukünftigen Experimenten eine mögliche Methylierungsänderung in partiell methylierten Zellen zu analysieren.

5.6 Abnahme der Hydroxymethylierung am Promotor von *DUSP2* und weiteren tumorassoziierten Genen in Folge einer CTCF-Überexpression / CTCF-Induktion

Die DNA-Methylierung an Position 5 des Cytosins (5mC) stellt einen epigenetischen Schlüsselmechanismus dar, der eine wesentliche Rolle in der Entwicklung sowie der Genom-Regulation spielt (Bestor & Coxon, 1993; Bird, 2002; Cedar & Bergman, 2009; Suzuki & Bird, 2008). Es ist schon seit Langem bekannt, dass verschiedene genomische Regionen in Abhängigkeit des Zell- und Gewebetyps sowie dem Entwicklungsstatus unterschiedlich methyliert sind (Suzuki & Bird, 2008). Dennoch ist der Mechanismus, der die 5mC-Dynamik kontrolliert, nicht vollständig geklärt. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die TET-Proteine die 5mC Oxidation katalysieren und 5mC-Derivate einschließlich 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) generieren. Zudem sind die Proteine der TET-Familie sowie die 5-Hydroxymethylierung in die normale Entwicklung sowie in viele Krankheiten involviert. Die epigenetische Markierung 5hmC wurde bereits 1953 von Wyatt & Cohen im T4-Bakteriophagen identifiziert und wurde später im Vertebraten-Hirn und diversen anderen Geweben wie Lunge, Leber, Niere, Darm und Rektum gefunden (Li & Wie, 2011; Globisch *et al.*, 2010; Kriaucionis & Heintz, 2009; Nestor *et al.*, 2011; Penn *et al.*, 1972; Song, C. X. *et al.*, 2011). In murinen embryonalen Stammzellen wurde über hohe 5hmC-Level berichtet, die signifikant während der Zelldifferenzierung abnehmen (Szwagierczak *et al.*, 2010; Tahiliani *et al.*, 2009) und in ausdifferenzierten Zellen, wie beispielsweise Purkinje Neuronen, wieder ansteigen (Kriaucionis & Heintz, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor sowohl in der Lungenkrebszelllinie H322, als auch in der embryonalen Nierenzelllinie HEK (TREx293-chCTCF) und schwächer in HeLa-Zellen detektiert (Abb. 4-23, 4-26). Genspezifische Daten hinsichtlich der 5hmC-Methylierung sind in der Literatur nicht zu finden. Song *et al.* detektierten 5hmC-Level sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen, allerdings in einem geringeren Maße als in murinen embryonalen Stammzellen. Die 5-Hydroxymethylierung macht Daten von Li und Liu zufolge 50% der Gesamtmethylierung in Nierengewebe aus, in Lungengewebe 17%. Diese relativ hohen 5hmC-Anteile finden sich auch in den Daten der vorliegenden Arbeit. In den beiden untersuchten *DUSP2*-Promotor-Regionen nahm die Hydroxymethylierung in der Lungenkrebszelllinie H322 sowie der embryonalen Nierenzelllinie HEK ca. 50% ein (Abb. 4-23).

Literaturbefunde berichten allerdings auch von einer Abnahme der 5-Hydroxymethylierung während der Tumorentwicklung korrelierend mit einer verringerten TET1-, TET2- und TET3-Expression. Eine dramatische Reduktion der 5hmC-Level wurde dabei in Brust-, Leber-, Lungen-, Bauchspeicheldrüsen- und Prostatakarzinomen gefunden (Yang *et al.*, 2013). Auch in gentechnisch veränderten Maus-Modellen wurde eine Abnahme von 5hmC während der Tumorentwicklung detektiert (Yang *et al.*, 2013). Dies steht in Kontrast zu dem hohen Methylierungsgrad am *DUSP2*-Promotor in H322-Zellen (Abb. 4-23), die einem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom entstammen. Ultrastrukturelle Studien dieser Zellen haben jedoch gezeigt, dass zytoplasmatische Strukturen, die charakteristisch für Clara-Zellen sind, vorliegen (www.phe-culturecollections.org). Clara-Zellen fungieren als Stammzellen und differenzieren zu Zilien tragenden Zellen (www.pschyrembel.de). Daher liegt die Vermutung nahe, dass dieser Stammzellcharakter die hohen 5hmC-Level bedingt. Gleiches ist für die embryonale Nierenzelllinie HEK anzunehmen.

Sowohl die transiente Überexpression von CTCF in H322-Zellen, als auch die Induktion von CTCF in TREx293-chCTCF-Zellen mittels Tetrazyklin resultierte in der Reexpression der *DUSP2*-RNA und in einer deutlichen Reduktion der 5hmC-Level an beiden untersuchten Regionen innerhalb des *DUSP2*-Promotors (Abb. 4-23), die mittels *TAB-Sequencing* inklusive Pyrosequenzierung detektiert wurde. Von der Abnahme der 5hmC-Level waren alle analysierten CpGs betroffen, wobei die Effekte in der Region unmittelbar vor dem Transkriptionsstart leicht stärker ausfielen (Reduktion: H322: 16%, TREx293-chCTCF: 23%), als in der *upstream* Region (Reduktion: H322: 11%, TREx: 13%).

Diese Abnahme der 5hmC-Level nach CTCF-Induktion zusammen mit einer Reexpression der RNA wurde nicht für *AATK* beobachtet (Daten nicht gezeigt). Mittels genomweiter Analysen in TREx293-chCTCF-Zellen konnten aber diverse tumorassoziierte Gene detektiert werden, die nach CTCF-Induktion eine erhöhte RNA-Expression sowie eine 5hmC-Reduktion aufwiesen (Tab. 4-5). Des Weiteren ist laut UCSC *Genome Browser*-Daten bei nahezu allen dieser Gene eine CpG-Insel-Promotormethylierung in Krebszellen bekannt und es existieren CTCF-Bindestellen intragenisch oder in der Promotorregion. Unter diesen CTCF-induzierten, tumorassoziierten Genen finden sich beispielsweise weitere Vertreter der *DUSP*-Familie (*DUSP8* und *DUSP10*) sowie die Tumorsuppressorgene *RASSF2*, *CDH1* und *TP53INP*. Erste Experimente auf Expressionsebene konnten die Daten des *Affimetrix human ST1.0S Arrays* für die Gene *RASSF2*, *DUSP8* und *DUSP10* bereits bestätigen (Abb. 4-33). Die Abnahme der 5-Hydroxymethylierung am Promotor dieser Kandidaten in Folge der CTCF-Induktion sollte zukünftig mittels *TAB-Sequencing* und Nachweis per Pyrosequenzierung verifiziert werden.

Aufgrund der Identifikation weiterer Kandidatengene ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt, um ein genspezifisches Ereignis für *DUSP2* handelt.

Derzeitige Modelle stützen sich auf die Hypothese, dass 5hmC ein Zwischenprodukt eines aktiven oder passiven Prozesses der DNA-Demethylierung in Stammzellen und Krebs-erkrankungen darstellt oder als bivalente Chromatinmodifikation agiert (Pastor *et al.*, 2013; Pfeiffer *et al.*, 2013; Wu & Zhang, 2011). Die beobachtete Reexpression von *DUSP2* nach CTCF-Induktion lässt sich nicht mit einem demethylierenden Prozess über 5hmC erklären, da die 5hmC-Level nach CTCF-Induktion deutlich verringert werden.

Ohm *et al.* sowie Widschwendter *et al.* suggerierten, dass ein Stammzell-ähnliches Chromatinmuster möglicherweise Tumorsuppressorgene für epigenetische Genstilllegung prädisponiert. Hochdurchsatz-Sequenzierung muriner, embryonaler Stammzell-DNA zufolge finden sich starke Anreicherungen von 5hmC innerhalb von Exons und in Nähe von Transkriptionsstartstellen (Williams *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). Ferner ist 5hmC an den Transkriptionsstartstellen von Genen mit H3K27me3- und H3K4me3-Markierungen im Promotorbereich verstärkt zu finden (Wu *et al.*, 2011). Analyse der globalen 5hmC-Verteilung in Kombination mit Genexpressionsprofilen in Wildtyp und Tet1-depletierten embryonalen Stammzellen deckten auf, dass 5hmC sowohl in intragenischen Regionen aktiv transkribierter Gene als auch in erweiterten Promotorregionen Polycomb-reprimierter Gene (Wu *et al.*, 2011) angereichert ist. Im Falle von *DUSP2* sowie den weiteren detektierten Genen könnte man sich vorstellen, dass ein Stammzell-(ähnliches)-Chromatinmuster in H322- und HEK-Zellen neben den hohen 5hmC-Level auch die epigenetische Stilllegung bedingt. Auffällig ist, dass vor allem in intragenischen Regionen die 5hmC-Level-Änderungen nach CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen hauptsächlich eine Abnahme von 5hmC betreffen (Abb. 4-31).

Der zugrundeliegende Mechanismus der Beobachtung, dass CTCF-Induktion in diesen Zelllinien zur Abnahme der 5hmC-Level am Promotor und zur Reexpression des jeweiligen Gens führt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, womit es zukünftig weiterer Analysen bedarf.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen zu reprimierter *TET1*-RNA-Expression führt (Abb. 4-28). TET1 gehört zu den Dioxygenasen, die die Oxidation von 5mC zu 5hmC katalysieren und eine Abnahme der Expression aller drei TET-Mitglieder wurde bereits mit verminderter 5-Hydroxymethylierung in Verbindung gebracht (Yang *et al.*, 2013). Auch die Depletion von CTCF resultierte in einer *TET1*-Expressionänderung (Abb. 4-28) und die Überexpression von *TET1* rief eine Verringerung der *DUSP2*-RNA-Expression hervor (Abb. 4-29). Eine mögliche Veränderung der 5hmC-Level am *DUSP2*-Promotor nach TET1-Überexpression konnte aufgrund von DNA-Qualitätsproblemen bislang nicht erfasst werden, sollte aber in künftigen Experimenten erneut analysiert werden. Die vorliegenden Daten weisen auf eine Verbindung der drei Gene *DUSP2*, *CTCF* und *TET1* hin.

Es ist bereits bekannt, dass TET1 an Transkriptionsstartstellen bindet und die Transkription durch Rekrutierung des SIN3A/HDAC-Komplexes reprimiert (Williams *et al.*, 2011). Ebenfalls wurde berichtet, dass CTCF mit dem SIN3A-Komplex interagiert (Lutz *et al.*, 2000). Ferner weisen UCSC *Genome Browser*-Daten des *DUSP2*-Locus darauf hin, dass eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und H3-Acetylierung besteht. Vorstellbar wäre ein Szenario bei dem CTCF einen repressiven Komplex bestehend aus Sin3A/HDAC und TET1 zerstört, was in einer Abnahme der 5hmC-Level und einer Reexpression von *DUSP2* resultiert (Abb.5-1a).

Denkbar wäre zudem, dass Methylbindepoteine eine Rolle spielen (Abb. 5-1a). Es ist bekannt, dass SIN3A mit dem 5hmC bindenden Protein MeCP2 interagiert, was wiederum zusammen mit HDACs agiert (Mellen *et al.*, 2012; Nan *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2003). Dies

suggeriert, dass 5hmC womöglich die Genaktivität über eine MeCP2/SIN3A/HDAC-Achse reprimiert. Auch die Beteiligung anderer 5hmC bindender Proteine wie MBD3 und UHRF1 (Frauer *et al.*, 2011; Yildirim *et al.*, 2011) ist nicht ausgeschlossen. MBD3 ist beispielsweise Teil des Mi2/NuRD-Komplex, der in die Genrepression involviert ist (Crook *et al.*, 2006). Yildirim *et al.* berichteten zudem, dass der MBD3/NuRD-Komplex die Expression von 5hmC markierten Genen in Abhängigkeit von TET1 in embryonalen Stammzellen reguliert.

Ein weiterer denkbarer molekularer Mechanismus der CTCF vermittelten *DUSP2*-Induktion beinhaltet die Beteiligung des *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) (Abb. 5-1b). CTCF interagiert mit dem PRC2-Komplex (Li *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011), der die Histonmethyltransferase EZH2 beinhaltet, die H3K27 trimethyliert. Diese Chromatinmarkierung interagiert mit TET-Proteinen (Neri *et al.*, 2013; Sui *et al.*, 2012), was zu der Annahme führt, dass ein repressiver Komplex am *DUSP2*-Promotor aus TET1/PRC2 besteht, der durch CTCF zerstört wird. Dies resultiert in einer Abnahme der 5hmC-Level und der *DUSP2*-Reexpression (Abb. 5-1b). In Kontrast zu den beiden zuvor aufgeführten Modellen wäre es auch vorstellbar, dass CTCF eine Dehydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor herbeiführt und dies einen repressiven Komplex beeinflusst, der abhängig von der 5hmC-Bindung ist (Abb. 5-1c). Auch hier könnten die 5hmC-bindenden Proteine MBD3, MeCP2 und UHRF1 eine Rolle spielen.

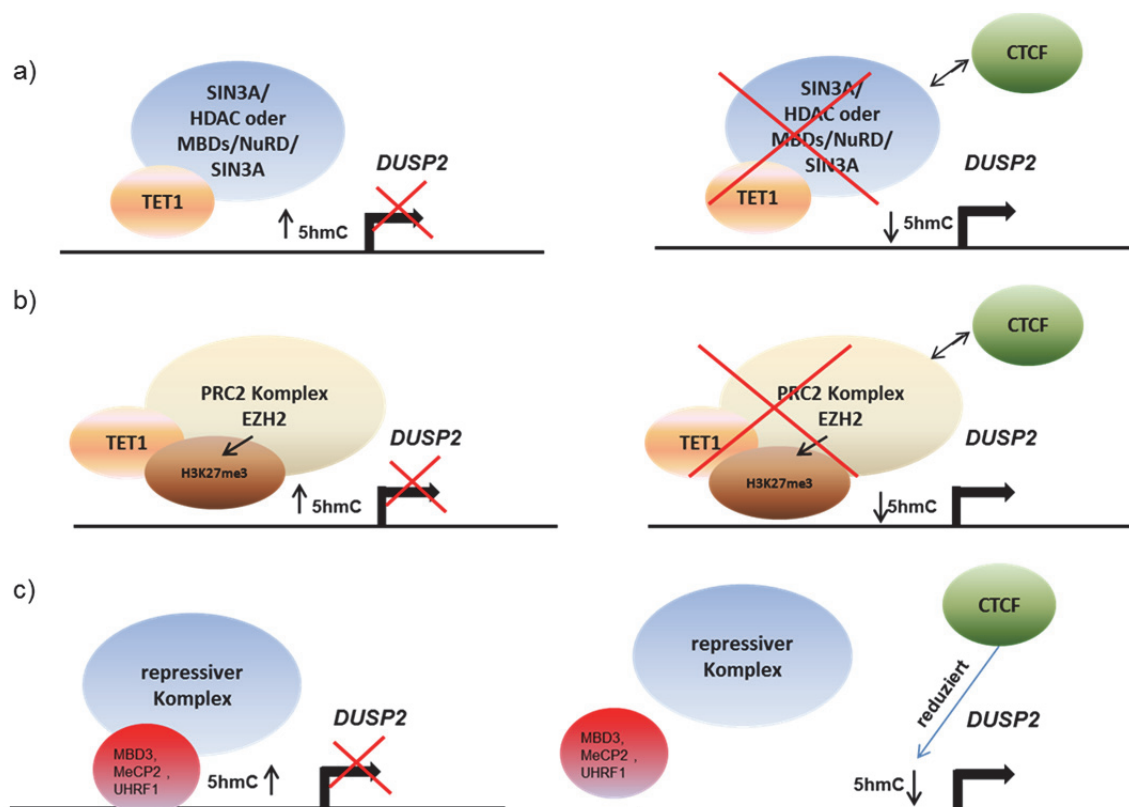


Abbildung 5-1: Mögliche molekulare Mechanismen der CTCF vermittelten Induktion von *DUSP2*. a) TET1 bindet an Transkriptionsstartstellen und reprimiert die Transkription durch Rekrutierung des SIN3A/HDAC-Komplexes. CTCF interagiert mit dem SIN3A-Komplex und *UCSC Genome Browser*-Daten weisen auf eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und H3-Acetylierung am *DUSP2*-Locus hin. Dies suggeriert, dass CTCF möglicherweise einen TET1/SIN3A/HDAC- oder einen MBD/NuRD/SIN3A-Komplex am *DUSP2*-Promotor zerstört, was folglich zur Abnahme der 5hmC-Level und zur Reexpression von *DUSP2* führt. b) CTCF interagiert nachweislich mit dem PRC2-Komplex, der die Histonmethyltransferase EZH2 beinhaltet, die H3K27 trimethyliert. Diese Chromatinmarkierung interagiert mit TET-Proteinen, was zu der Annahme führt, dass ein repressiver Komplex am *DUSP2*-Promotor aus TET1/PRC2 besteht, der durch CTCF zerstört wird. Dies resultiert in einer Abnahme der 5hmC-Level und der *DUSP2*-Reexpression. c) Ein repressiver Komplex am *DUSP2*-Promotor ist abhängig von der 5hmC-Bindung und die Genaktivierung ist bedingt durch die CTCF induzierte Reduktion der 5hmC-Level. Faktoren die 5hmC binden können und damit involviert sein könnten, sind MBD3, MeCP2 und /oder UHRF1.

Entgegen der Erwartung führte die CTCF-Depletion in HeLa-Zellen nicht zu einem Anstieg der Hydroxymethylierung am *DUSP2*-Promotor (Abb. 4-26). Möglicherweise sind die Methylierungslevel in dieser Zelllinie zu gering, um Effekte erfassen zu können und man sollte zukünftig auf Zelllinien mit partiell methyliertem *DUSP2*-Promotor zurückgreifen.

Die Abnahme der Hydroxymethylierung wurde neben dem *TAB-Sequencing* auch mittels MeDIP erfasst (Abb. 4-24), wobei die Ergebnisse verifiziert werden konnten. Auch die genomweiten Analysen zeigen an, dass weitere CpGs im *DUSP2*-Gen eine Abnahme der 5hmC-Level nach CTCF-Induktion aufweisen.

5.7 BORIS induziert im Gegensatz zu seinem Paralog CTCF nicht die Induktion von *AATK* und *DUSP2*

BORIS oder CTCFL wurde als paraloger Faktor von CTCF identifiziert. Aufgrund der stark homologen 11-Zinkfinger-Region, die für die Bindung an DNA verantwortlich ist, wurde bereits früh vermutet, dass die beiden Faktoren dieselben Sequenzen binden können und bei gleichzeitiger Expression um diese Bindestellen konkurrieren. Die flankierenden N- und C-terminalen Sequenzen beider Proteine weisen jedoch große Unterschiede auf, was zu der Annahme führte, dass die Bindestellen zwar identisch, die Funktionen beider Proteine aber unterschiedlich oder sogar gegensätzlich sind (Jelinic *et al.*, 2006; Klenova *et al.*, 2002). CTCFL wird eine aktivierende Funktion bei der Genexpression zugeschrieben (Fillipova *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2005; Lutz *et al.*, 2000; Vatolin *et al.*, 2005). So können beispielsweise die H3K4 Methyltransferase SET1A und der Co-Chaperon-Rekrutierer BAT3 durch Bindung von BORIS an Promotorbereiche von Genen rekrutiert werden und folglich die Aktivierung der entsprechenden Gene auslösen (Nguyen *et al.*, 2008a). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach transienter BORIS-Überexpression keine RNA-Reexpression von *DUSP2* oder *AATK*, wie nach CTCF-Überexpression beobachtet, erfasst werden (Abb. 4-27). Auch eine Änderung der Methylierung am *DUSP2*-Promotor wurde nicht detektiert (Abb. 4-27), was auf ein unterschiedliches Verhalten der beiden Faktoren schließen lässt. Nguyen *et al.* zufolge bindet CTCFL sowohl an unmethylierte, als auch an methylierte Bindestellen und bei gleichzeitigem Vorhandensein beider Proteine kommt es zu einer Konkurrenz um unmethylierte Bindestellen, wobei BORIS durch die stärkere Bindungsaffinität von CTCF an unmethylierte Sequenzen verdrängt wird. Bekannt ist weiterhin, dass CTCF selbst im BORIS-Promotorbereich bindet und die Expression hemmt (Renaud *et al.*, 2007). Unterschiedliche Effekte von CTCF und BORIS bei der Bindung der gleichen Bindestelle lassen sich auch auf verschiedene Histonmodifikationen zurückführen. Sun *et al.* konnten diesbezüglich zeigen, dass CTCF bei Vorlage eines niedrigen H3K4me2 / H3K9me2-Verhältnisses im Promotorbereich des *BAG1*-Gens bindet und die *BAG1*-Expression reprimiert. Ein hohes H3K4me2 / H3K9me2-Verhältnis resultiert in der Bindung von BORIS im *BAG1*-Promotorbereich und einer Zunahme der *BAG1*-Expression (Sun *et al.*, 2008). Aufgrund der Beobachtung, dass BORIS keine Expressions- und DNA-Promotor-methylierungsänderungen von *AATK* und *DUSP2* hervorgerufen hat, wurden keine weiteren funktionellen Untersuchungen mit BORIS durchgeführt.

5.8 Genomweit wird ein geringer Anteil an Genen von CTCF und BORIS dereguliert

Den genomweiten Analysen zufolge wurden mittels CTCF-Induktion in TREx293-chCTCF-Zellen 14% der im Array erhaltenen Gene hinsichtlich der RNA-Expression dereguliert (Abb. 4-32), wobei 64% dieser Gene nach CTCF-Induktion hochreguliert wurden. CTCF-*Knockdown* in HeLa-Zellen führte überwiegend zu einem Anstieg der Genexpression (60% der deregulierten Gene) (Wendt *et al.*, 2008). Auch die genomweiten Analysen hinsichtlich der Methylierung (5mC und 5hmC) zeigten, dass die meisten CpG's unbeeinflusst von der CTCF-Induktion blieben (Abb. 4-30). Aufgezeigt werden konnte allerdings, dass die Hydroxymethylierung stärker beeinflusst wird als die Gesamtmethylierung, was die Bedeutsamkeit dieser Modifikation unterstreicht (Abb. 4-30, 4-31). Die größten Änderungen hinsichtlich der 5hmC-Level wurden in der intragenischen Region, im ersten Exon sowie in der Region TSS200 (-200 bis TS) beobachtet (Abb. 4-31). In murinen embryonalen Stammzellen sind hoch-transkribierte Gene mit CpG-reichem Promotor mit hohen 5mC/5hmC-Levels in der intragenischen Region assoziiert (Wu & Zhang, 2011). Aktiv transkribierte Gene mit CpG armen Promotoren zeichnen sich durch geringe oder mittlere 5hmC-Levels sowohl in der Promotorregion als auch innerhalb der intragenischen Region aus (Wu & Zhang, 2011). Polycomb reprimierte Gene weisen hingegen eine 5hmC-Anhäufung im Bereich von CpG-Inseln auf (Wu & Zhang, 2011). Im Gegensatz dazu besitzen stillgelegte Gene wenig 5mC und 5hmC am proximalen Promotor (Wu & Zhang, 2011). Interessanterweise betreffen die durch CTCF-hervorgerufenen Änderungen sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der 5hmC-Level. Zukünftige Analysen könnten sich stärker auf die bioinformatische Auswertung der genomweiten Daten stützen, um mehr über die beeinflussten CpGs bzw. die zugehörigen Gene zu erfahren. Ein generelles Problem des verwendeten *Tet-on*-Systems besteht in der sogenannten *leakiness* des Systems. Dies bedeutet, dass eine basale chCTCF-Expression auch in uninduzierten Zellen vorliegt, was möglicherweise dazu führt, dass uninduzierte Zellen bereits dereguliert werden. Liegt für die betroffenen Gene bereits ein gesättigter Zustand vor, so führt Erhöhung der chCTCF-Menge durch Tetrazyklininduktion zu keinem zusätzlichen Effekt mehr. Zurückzuführen ist die basale Expression auf geringe Mengen an Tetrazyklin, die im fötalen Kälberserum (FCS), das dem Medium zugesetzt wird, enthalten sein können und ausreichen, um die Expression anzuschalten. Für die Experimente wurde Tetrazyklin-reduziertes FCS verwendet, dennoch konnte die basale chCTCF-Expression nicht gänzlich verhindert werden (Abb. 4-17).

Transiente Überexpression von BORIS in HEK-Zellen resultierte genomweit in einer Deregulation von 5% der im Array erhaltenen Gene. Davon wiesen 71% eine Hochregulation und 29% eine Herunterregulation auf (Abb. 4-32). Eine andere Dissertation berichtet von einem ähnlichen Experiment, bei dem nach BORIS-Induktion in einem induzierbaren murinen embryonalen Fibroblasten-Klon die Hälfte der durch BORIS deregulierten Gene eine Zunahme der Expression aufwies (Dienstbach, 2012). Nach der von Nguyen *et al.* vorgeschlagenen Konkurrenz von CTCF und BORIS um Bindestellen im Genom, könnte die BORIS-Überexpression zu einer Verdrängung von CTCF an den jeweiligen Bindestellen führen. Auch wenn BORIS nicht direkt die Expression eines jeweiligen Gens beeinflusst, könnte die Konkurrenz in einem Verlust der CTCF-Regulation und folglich der Deregulation resultieren.

5.9 Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit konnte das Apoptose-assoziierte Tyrosinkinase-Gen (*AATK*) als epigenetisch inaktiviertes Zielgen in humanen Krebserkrankungen identifiziert werden. Um *AATK* möglicherweise als prognostischen Marker in der Krebsforschung nutzen zu können, bedarf es weiterer Forschungsanstrengung. Unter anderem sollte das Spektrum der betroffenen Tumorentitäten erweitert werden. Literaturdaten zufolge ist die *AATK*-Expression in Adenokarzinomen des Darms sowie das *AATK*-Proteinlevel in Darmpolypen vermindert, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht aufgedeckt wurde (Lee *et al.*, 2006). Um die Beteiligung einer *AATK*-Promotormethylierung in der Darmkrebsentwicklung aufzudecken, könnten Expressionsanalysen nach Aza-Behandlung durchgeführt werden. Auch *AATK*-Proteinlevel sollten zukünftig betrachtet werden. Weiterhin interessant wäre es zu analysieren, ob in der kodierenden oder den regulatorischen *AATK*-Sequenzen SNPs vorliegen und mit Tumoren assoziiert sind. Unerlässlich für künftige Studien ist es, die Funktion von *AATK* während der Karzinogenese näher zu charakterisieren und Interaktionspartner bzw. Zielproteine, die von *AATK* phosphoryliert werden, zu detektieren. Ebenfalls sollte der funktionale Zusammenhang zwischen epigenetischer Inaktivierung in Krebszelllinien und Primärtumoren mit der Unfähigkeit von epithelialen Zellen zu differenzieren und in Apoptose zu gehen, analysiert und aufgedeckt werden. Aufgrund der Tatsache, dass bereits eine *AATK-Knockout*-Maus etabliert wurde, könnte diese genutzt werden, um Veränderungen hinsichtlich der Tumorgenese zu analysieren. Gleiches gilt für die ebenfalls verfügbare *DUSP2-Knockout*-Maus.

Auch für *DUSP2* konnte eine epigenetische Inaktivierung in humanen Krebszelllinien nachgewiesen werden. Die generierten Daten deuten weiterhin an, dass *DUSP2* in die Tumorgenese von Merkelzellkarzinomen involviert ist. Um dies zu bekräftigen sollte die Analyse in Merkelzellkarzinomen und ggfls. anderen Hauttumoren erweitert werden, wobei auch RNA- und Protein-Expressionsanalysen durchgeführt werden sollten. Auch eine Beteiligung von *DUSP2* in der Tumorgenese von Ovarialkarzinomen liegt nahe, die näher charakterisiert werden sollte.

Hinsichtlich der CTCF-induzierten Dehydroxymethylierung mit gleichzeitiger Reexpression des betroffenen Gens gilt es zunächst, die Daten der genomweiten Analysen für die identifizierten Kandidatengene zu verifizieren. Infolgedessen wird ersichtlich, ob diese Beobachtung tatsächlich, wie anhand der Array-Daten zu vermuten, bei weiteren Genen zu finden ist oder ob es sich um ein genspezifisches Ereignis für *DUSP2* handelt. Zudem sollte das Spektrum an zu analysierenden Zelllinien erweitert werden. Bisher beschränkte sich die Analyse hinsichtlich der 5hmC-Level nach CTCF-Induktion auf HEK- und H322-Zellen, beide mit Stammzellcharakter. Daher sollten in zukünftige Untersuchungen diverse Zelllinien unterschiedlicher Krebsentitäten mit einbezogen werden. Unabhängig davon sollten weitere Regionen im *DUSP2*-Locus, wie andere Promotorregionen, intragenische CTCF-Bindestellen und flankierende Regionen, hinsichtlich der 5mC- und 5hmC-Level betrachtet werden und damit die Daten des Methylierungsscreens validiert werden. Neben der Analyse der 5-Hydroxymethylierung mittels TAB-Sequencing und MeDIP könnte alternativ auch das *oxidative bisulfite sequencing* eingesetzt werden. Auch die Betrachtung weiterer Derivate der Tet-initiierten DNA-Demethylierung wie etwa 5-Formylcytosin (5fC) oder 5-Carboxylcytosin (5caC) sollte vorgenommen werden. Allerdings beschränkt sich die Analyse dieser Modifikationen derzeit auf die Verwendung von Antikörpern im Rahmen von MeDIP, wobei möglicherweise hohe Hintergrundsignale zu erwarten sind. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die Veränderung von Histonmodifikationen während der Dehydroxymethylierung nach

CTCF-Induktion. Um dies zu erfassen, würden sich ChIP-Experimente mit spezifischen Antikörpern für Histonmodifikationen, die mit bestimmten Chromatinmustern assoziiert sind, anbieten. Einer der wichtigsten Aspekte, die künftig geklärt werden sollten, ist der molekulare Mechanismus der CTCF vermittelten Induktion von *DUSP2* und weiteren Kandidaten. Wie bereits unter Punkt 5.6 (Abb. 5-1) erläutert sind zwei wesentliche Mechanismen denkbar. Einerseits das Szenario, dass CTCF einen TET(1) beinhaltenden repressiven Komplex zerstört und damit die Genstilllegung von *DUSP2* aufhebt. Die Abnahme der 5-Hydroxymethylierung wäre in diesem Fall eher die Konsequenz, als der Grund der aufgehobenen Stilllegung. Bei dem zweiten Mechanismus würde man davon ausgehen, dass der repressive Komplex von der 5hmC-Bindung abhängt und die Genaktivierung durch CTCF induzierte Reduktion der 5hmC-Level zustande kommt. Um die These der ersten Möglichkeit zu belegen, müsste zunächst mittels ChIP-Analysen geklärt werden, welche Faktoren den repressiven Komplex bilden (z.B. SIN3A, TET1, HDACs, MBD, EZH2) und ob die Bindung nach CTCF-Induktion verändert wird. Nach Identifikation der beteiligten Faktoren könnte über RNAi- und Überexpressions-Experimente der einzelnen Komponenten die jeweilige genregulatorische Funktion erfasst werden. Da EZH2 beispielsweise H3K27 trimethyliert und diese Chromatinmarkierung mit TET-Proteinen interagiert und über Histonacetylierung die Aktivität von HDACs bestimmt werden kann, sollten auch Histonmodifikationen betrachtet werden. Um die zweite mechanistische Möglichkeit zu belegen, ist es ebenfalls notwendig, zunächst die beteiligten 5hmC-bindenden Proteine (z.B. MeCP2, MBD3, UHRF1) zu identifizieren bzw. eine Bindung am *DUSP2*-Promotor mittels ChIP nachzuweisen. Ebenfalls sollte die Bindung nach CTCF-Induktion jeweils analysiert werden. Auch RNAi-Experimente nach Identifikation der beteiligten Faktoren mit anschließender Erfassung des Einflusses auf *DUSP2* wären denkbar.

6 Anhang

6.1 Ergänzung zur Methylierungsanalyse von *RASSF2* und vollständige Ergebnisse der Methylierungsanalyse von *DUSP2* und *RASSF5* in Primärtumoren



Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der CpG-Insel von *RASSF2* im Promotorbereich sowie der *TaqI*-Schnittstelle innerhalb der mittels PCR amplifizierten Region. Die CpG-Dinukleotide sind jeweils durch einen senkrechten, schwarzen Strich gekennzeichnet. Die verwendeten Primer zur Amplifikation des zu untersuchenden Bereichs sind durch Pfeile dargestellt. Der Transkriptionsstart (TS) ist ebenfalls hervorgehoben. Der untere Bildabschnitt zeigt die im PCR-Produkt enthaltene *TaqI*-Schnittstelle.

Tabelle 6-1: Vollständige Methylierungsdaten von *DUSP2*, *RASSF5A* und *RASSF5C* in Merkelzellkarzinomen

Probenbezeichnung	<i>DUSP2</i>	<i>RASSF5A</i>	<i>RASSF5C</i>
MCC 5a	m	m	n.a.
MCC 15	n.a.	n.a.	u
MCC 20a	n.a.	n.a.	u
MCC 21	n.a.	u	u
MCC 22b	u	m	u
MCC 23	n.a.	u	n.a.
MCC 30	n.a.	n.a.	u
MCC 31	n.a.	m	m
MCC 35	n.a.	u	u
MCC 36	n.a.	u	u
MCC 38	n.a.	u	u
MCC 39	n.a.	u	u
MCC 42	u	u	u
MCC 43	m	m	u
MCC 46	n.a.	u	n.a.
MCC 47	n.a.	u	n.a.
MCC 49	u	m	n.a.
MCC 50	n.a.	u	m
MCC 51	m	m	u
MCC 52	u	m	u
MCC 54	m	m	n.a.
MCC 56	n.a.	m	n.a.
MCC 58	n.a.	m	n.a.
MCC 59	m	n.a.	n.a.
MCC 60	n.a.	m	n.a.
MCC 64	n.a.	u	n.a.
MCC 71	n.a.	u	n.a.
MCC 73	n.a.	u	n.a.
MCC 81	n.a.	u	n.a.
MCC 85	u	u	u
MCC 86	u	u	n.a.
MCC 88	u	u	n.a.
MCC 90	n.a.	u	u
MCC 91	u	u	u
MCC 94	u	u	u

MCC 95	m	m	u
MCC 96	m	m	u
MCC 97	u	m	u
MCC 98	m	m	u
MCC 99	m	u	u
MCC 100	m	u	u
MCC 101	u	m	u
MCC 102	u	m	u
NH 1	u	m	u
NH 6	u	u	u
NH 7	u	u	n.a.
NH 8	m	m	u
NH 9	u	m	u
NH 10	u	u	u
NH 13	u	n.a.	u
NH15	u	n.a.	u
NH 18	u	n.a.	u
NH 22	u	u	u
NH 23	u	n.a.	u
NH 27	u	n.a.	u

Bei der Angabe des Methylierungsstatus wurde nur zwischen Vorlage einer Methylierung (m) bzw. keiner Methylierung (u) differenziert. (n.a.: nicht analysiert; MCC: Merkelzellkarzinom; NH: Normalhaut bzw. benignes Nävuszellnävi)

Tabelle 6-2: Vollständige Methylierungsdaten von *DUSP2*, *RASS5A* und *RASSF5C* in Phäochromozytomen

Probenbezeichnung	<i>DUSP2</i>	<i>RASSF5A</i>	<i>RASSF5C</i>
45	u	m	u
90	u	m	u
133	u	u	u
361	u	m	u
600	u	u	u
692	u	m	u
742	u	u	u
872	u	m	u
965	u	m	u
1054	u	m	u
1177	u	m	u
1238	u	m	u
1467	u	m	u
1479	u	m	u
1512	u	m	u
1592	u	m	u
1617	u	u	u
1755	u	m	u
1778	u	u	u
1796	u	m	u
1852	u	m	u
1857	u	u	u
1881	u	m	u
1884	u	m	u
1887	u	u	u
1919	u	u	u
2053	u	m	u
2106	u	m	u
2115	u	u	u
2225	u	m	u
2324	u	m	u
2338	u	u	u

2348	u	m	u
------	---	---	---

Bei der Angabe des Methylierungsstatus wurde nur zwischen Vorlage einer Methylierung (m) bzw. keiner Methylierung (u) differenziert. (n.a.: nicht analysiert).

Tabelle 6-3: Vollständige Methylierungsdaten von *DUSP2*, *AATK* und *RASSF5C* in primären Lungentumoren

Proben-bezeichnung	<i>DUSP2</i>	<i>RASSF5C</i>	Proben-bezeichnung	<i>AATK</i> (downstream TS)
BZK 1	n.a.	u	TA 14	m
BZK 2	u (5%)	u	TA 59	m
BZK 3	n.a.	u	TA 74	m
BZK 4	n.a.	u	TA 94	m
BZK 5	n.a.	u	TA 247	u
BZK 6	u (3%)	u	TS 02	u
BZK 7	n.a.	u	TS 03	u
BZK 8	u (4%)	u	TS 12	u
BZK 9	n.a.	u	TS 29	u
BZK 10	u (10%)	u	TS 37	m
BZK 11	n.a.	u	TS 41	m
BZK 12	n.a.	u	TS 42	u
BZK 13	n.a.	u	TS 71	u
BZK 14	n.a.	u		
BZK 15	n.a.	u		
BZK 16	n.a.	u		
BZK 17	u (10%)	u		
BZK 18	u (10%)	u		

Die Prozentzahlen stellen quantitative Methylierungswerte dar, die durch Pyrosequenzierung ermittelt wurden. Die Methylierungsdaten für die *AATK*-Region downstream des TS wurden von C. Herkt generiert. Bei der Angabe des Methylierungsstatus wurde nur zwischen Vorlage einer Methylierung (m) bzw. keiner Methylierung (u) differenziert. Weitere Proben von kleinzelligen Lungentumoren wurden hinsichtlich der *AATK*-Methylierung durch S. Walesch untersucht (Haag *et al.*, noch unpubliziert). (n.a.: nicht analysiert; BZK: kleinzellige Lungentumore; TA: primäre Lungenadenokarzinome; TS: primäre Plattenepithelkarzinome)

Tabelle 6-4: Vollständige Methylierungsdaten von *DUSP2* und *AATK* in primären Mammakarzinomen sowie korrespondierendem Brustnormalgewebe (links) und Methylierungsstatus von *RASSF5C* in primären Ovarialkarzinomen (rechts)

Proben-bezeichnung	<i>DUSP2</i>	<i>AATK</i> (downstream TS)	Proben-bezeichnung	<i>RASSF5C</i>
B1 T	u	m	3	u
B2 T	u	u	4	u
B3 T	u	m	6	u
B4 T	u	m	22	u
B5 T	u	m	37	u
B6 T	u	m	43	m
B7 T	u	m	45	u
B8 T	u	m	49	m
B9 T	u	m	51	u
B10 T	u	n.a.	55	u
B11 T	u	n.a.	56	u
B12 T	u	n.a.		
B4 N	u	m		
B7 N	u	m		
B9 N	u	m		
B10 N	u	m		
B11 N	u	m		
B12 N	u	m		

Die Gewebeproben mit der gleichen Nummer sind Tumorproben (T) und dazugehörige Gewebeproben von nicht verändertem Gewebe (N) einer Patientin. Die Daten der Methylierungsanalyse in Brustgewebe wurden von C. Herkt generiert. Bei der Angabe des Methylierungsstatus wurde nur zwischen Vorlage einer Methylierung (m) bzw. keiner Methylierung (u) differenziert. (n.a.: nicht analysiert). Weitere Proben wurden hinsichtlich der *AATK*-Methylierung durch S. Walesch untersucht (Haag *et al.*, noch unpubliziert).

6.2 Einfluss von CTCF in dem stabil induzierbaren TREx293-chCTCF-Zellklon A2 auf die *AATK*-, *DUSP2*- und *TET1-3* RNA-Expression

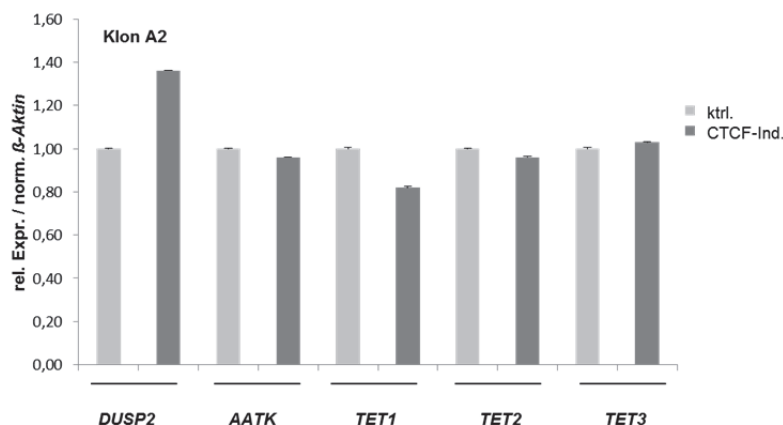


Abbildung 6-2 : Auswirkung der CTCF-Induktion im stabil induzierbaren Zellklon A2 auf die *AATK*-, *TET1-3* und *DUSP2*-RNA-Expression. TREx293-Zellen, die stabil den Tet-Repressor exprimieren wurden mit dem Expressionsvektor pcDNA4TO-chCTCF transfiziert und über Zeocin selektioniert. Die chCTCF-Expression wurde durch Zugabe von Tetrazyklin über zwei Tage ermöglicht. Der Einfluss der CTCF-Induktion auf die RNA-Expression von *AATK*, *TET1-3* und *DUSP2* wurde mittels quantitativer RT-PCR erfasst, wobei die spezifische Genexpression auf β -Aktin normalisiert und die Werte der uninduzierten Kontrolle gleich eins gesetzt wurden. In die Auswertung der quantitativen RT-PCRs wurden die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten einbezogen, wobei für jede qRT-PCR Triplikate bestimmt wurden.

6.3 Ergänzung zum Einfluss einzelner CTCF-Domänen auf die RNA-Expression von *DUSP2* und *AATK*

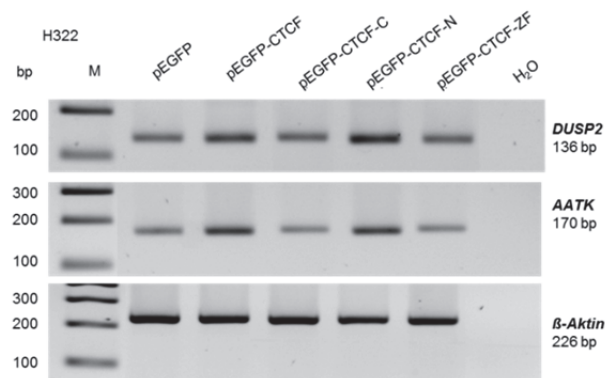


Abbildung 6-3: Einfluss transients Überexpression einzelner CTCF-Domänen auf die RNA-Expression von *DUSP2* und *AATK*. H322 Zellen mit methyliertem *DUSP2* und *AATK*-Promotor wurden mit chCTCF-Konstrukten, die nur einzelne chCTCF-Domänen enthalten (pEGFP-CTCF-N-, pEGFP-CTCF-C, pEGFP-CTCF-ZF) sowie *full length* CTCF und einer Leervektorkontrolle transient transfiziert. Nach 2 d folgte die RNA-Isolation und die Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkription und die Amplifikation mit cDNA-Gen-spezifischen Primerpaaren. Der Expressionsnachweis wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem 100 bp Marker (M) im 2%-igen Agarosegel erbracht. Eine RT-PCR mit dem *housekeeping* Gen β -Aktin wurde durchgeführt, um nachweisen zu können, dass äquivalente Mengen an cDNA amplifiziert wurden.

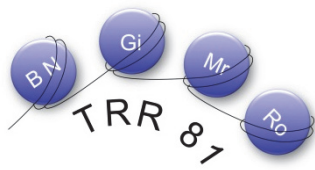
6.4 Ausschnitte durchgeführter Sequenzierungen



Sequenzierung von pRLNull-DUSP2-Promotor
mit Deletion beider CTCF-Bindestellen :



6.5 PhD Portfolio des Graduiertenkollegs MGK



PhD Portfolio – MGK

Summary of PhD training



Name of PhD student: Tanja Haag

Affiliation:

Institut für Genetik

Justus-Liebig-Universität Gießen

Heinrich-Buff-Ring 58-62

D-35392 Gießen

tel: 0641-99-35462

e-mail: Tanja.Haag@gen.bio.uni-gießen.de

Start of PhD work: 01/10/2010

Topic of PhD thesis work:

Mechanisms of epigenetic regulation of tumor suppressor genes

Thesis committee:

1. Prof. Dr. R. Dammann

2. Prof. Dr. L. Schmitz

3. Prof. Dr. G. Dobrev

Meetings of the thesis committee:

- Gießen; 09/06/11 (TRR seminar)
- Gießen 12/-14/09/11 (TRR81 Symposium)
- Gießen; 09/08/12 (TRR seminar)
- KWT 28/02/12
- Egmond an Zee; 02/09/13 (TRR Symposium)

PhD training**General courses****Specific courses**

- Statistikkurs "Einführung in die angewandte Statistik mit SPSS20" (Gießen; 20-23/02/2012; workload; 20 h)

Seminars and workshops

- Transregio 81 Seminar (Gießen; 21/10/10; workload: 2 h)
- UGMLC Seminar (Gießen; 16/11/10; workload: 1 h)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 02/12/10; workload: 2 h)
- MGK-Chromatin Methods Club: SILAC and mass spectrometry
(18/01/11; Marburg; workload: 1 h)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 03/02/11; workload: 2 h)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 07/04/11; workload: 2,5 h)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 09/06/11; workload: 2,5 h)
- Transregio 81 Seminar – guest talk Dr. K. Wendt
(Gießen; 29/08/11; workload: 1 h)
- MGK-Chromatin Methods Club: RNAi methods/RNAi screens
(Marburg 20/09/11; workload: 1 h)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 06/10/11; workload: 2 h)
- MGK-Chromatin Methods Club: Topic: "Deep sequencing"
(Marburg; 08/11/2011; workload: 1 h)
- PhD minisymposium „SUMO meets chromatin“
(Marburg; 12/12/11; workload: 1 d)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 14/06/12; workload: 2,5 h)
- PhD Minisymposia "*DNA/RNA methylation in malignancies and differentiation*" (Gießen; 26/06/12; workload: 1 d)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 04/10/12; workload: 2 h)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 04/04/13; workload: 2 h)
- Transregio 81 Seminar (Gießen; 13/06/13; workload: 2 h)

- Transregio 81 Seminar (Gießen; 12/12/13; workload: 2 h)

Presentations:

Journal Club:

HDAC3 is negatively regulated by the nuclear Protein DBC1 / Rsf-1, a chromatin remodelling protein, induces DNA damage and promotes genomic instability (Gießen; 28/01/11; workload: 1 h)

The tumorsuppressor gene ARHI suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways / Transcription factor BORIS directly induces expression of a cancer-testis antigen; TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter (Gießen; 29/07/11; workload: 1 h)

CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing / Regulation of chromatin organization and inducible gene expression by a drosophila insulator (Gießen; 02/12/11; workload: 1 h)

The histone demethylase Kdm3a is essential to progression through differentiation / Histone H1 Depletion impairs embryonic differentiation (Gießen; 06/07/12; workload: 1 h)

A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection / Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness (Gießen; 09/11/12; workload: 1 h)

Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis / Coordinate regulation of DNA methylation and H3K27me3 in mouse embryonic stem cells (Gießen; 22/03/2013; workload: 1 h)

KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signaling / Oct4 interaction with hmgb2 regulates akt signaling and pluripotency (Gießen; 02/08/2013; workload: 1 h)

Wednesday-Seminar:

Presentation of my results; Mechanisms of epigenetic regulation of tumor suppressor genes (Gießen; 11/05/11; workload: 1 h)

Presentation of my results; CTCF mediated regulation of putative TSGs (Gießen; 22/02/12; workload: 1 h)

Presentation of my results; CTCF mediated regulation of putative TSGs (Gießen; 06/03/2013; workload: 1 h)

Presentation of my results; CTCF mediated regulation of putative TSGs (Gießen; 28/01/2014; workload: 1 h)

Transregio 81 Seminar:

Presentation to the topic “Mechanisms of epigenetic regulation of tumor suppressor genes” (Gießen; 09/06/11; workload: 0,5 h)

Presentation to the topic “CTCF dependent mechanism of epigenetic regulation of tumor suppressor genes” (Gießen; 09/08/12; workload: 0,5 h)

Chromatin Methods Club:Retreats:

KWT 26.02-02.03.12 (talk: CTCF mediated regulation of putative TSGs)

(Inter)national conferences

International symposium 2011 – Chromatin changes in differentiation and malignancies (12/-14/09/2011; Gießen) – poster presentation

International symposium 2013 – Chromatin changes in differentiation and malignancies (02/-04/09/2013; Egmond an Zee, Netherlands)

Cell Symposia: Cancer Epigenomics 2013 (06/-08/10/2013 Sitges, Spain) - poster presentation

Organisation of student workshops/minisymposia on specific topics

Organization of the 3rd TRR81 PhD Minisymposia “*DNA/RNA methylation in malignancies and differentiation*” (Gießen; 26/06/12)

Others

- Supervising “*Projektpraktikum*” (8/11/10-26/11/10)
- Supervising “Masterthesis” (07/02/11-05/08/11)
- Supervising “Bachelorthesis” (04/07/11-26/08/11)
- Supervising “Masterthesis” (12/09/11-03/08/12)
- Supervising “*Projektpraktikum*” (29/11/12-16/12/12)
- Supervising “Masterthesis” (11/02/13-29/01/2014)
- Supervising “Bachelorthesis” (24/06/13-30/08/13)
- Supervising “Masterthesis” (04/10/2013-04/08/2014)

7 Literaturverzeichnis

- Aoyama, Y., Avruch, J., Zhang, X.F. „Nore1 inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases.“ *Oncogene*, 2004, 23(19):3426-33.
- Arnold, R., Burcin, M., Kaiser, B., Muller, M., Renkawitz, R. „DNA bending by the silencer protein NeP1 is modulated by TR and RXR.“ *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(14):2640-7.
- Baniahmad, A., Steiner, C., Köhne, A.C., Renkawitz, R. „Modular structure of a chicken lysozyme silencer: Involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site.“ *Cell*, 1990, 61(3):505-14.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K. „High-resolution profiling of histon methylations in the human genome.“ *Cell*, 2007, 129(4):823-37.
- Bell, A.C., Felsenfeld, G. „Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene.“ *Nature*, 2000, 405(6785):482-5.
- Bell, A.C., West, A.G., Felsenfeld, G. „The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators.“ *Cell*, 1999, 98(3):387-96.
- Bersaglieri, T., Sabeti, P.C. *et al.* „Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene.“ *American journal of human genetics*, 2004, 74(6):1111-1120.
- Bestor, T. H., Coxon, A. „Cytosine methylation: the pros and cons of DNA methylation.“ *Curr. Biol.* 3, 1993, 3(6):384-386.
- Bestor, T. H. „The DNA methyltransferases of mammals.“ *Hum Mol Genet.*, 2000, 9(16):2395-402.
- Bird, A. „DNA methylation patterns and epigenetic memory.“ *Genes Dev.*, 2002, 16(1):6-21.
- Boschert, U., Muda, M., Camps, M., Dickinson, R., Arkinstall, S. „Induction of the dual specificity phosphatase PAC1 in rat brain following seizure activity.“ *Neuroreport*, 1997, 8(14):3077-80.
- Canto-Soler, M.V., Huang, H., Romero, M.S., Adler, R. „Transcription factors CTCF and Pax6 are segregated to different cell types during retinal cell differentiation.“ *Dev Dyn*, 2008, 237(3):758-67.
- Cedar, H., Bergman, Y. „Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms.“ *Nat. Rev. Genet.*, 2009, 10(5):295-304.
- Chen, J., Lui, W.O., Vos, M.D., Clark, G.J., Takahashi, M., Schoumans, J., Khoo, S.K., Petillo, D., Lavery, T., Sugimura, J. *et al.* „The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas.“ *Cancer Cell*, 2003, 4(5):405-13.

- Chen, Y.R., Han, J., Kori, R., Kong, A.N., Tan, T.H. „Phenylethyl isothiocyanate induces apoptotic signaling via suppressing phosphatase activity against c-Jun N-terminal kinase.“ *J Biol Chem*, 2002, 277(42):39334-42.
- Chen, Y.R., Shrivastava, A., Tan, T.H. „Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of JNK by hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate.“ *Oncogene*, 2001, 20(3):367-74.
- Chien, A., Edgar, D. B., Trela, J. M. „Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*.“ *J Bacteriol.*, 1976, 127(3):1550-7.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., Mann, M. „Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions.“ *Science*, 2009, 325(5942):834-40.
- Crook, J.M., Dunn, N.R., Colman, A. „Repressed by a NuRD.“ *Nature cell biology*, 2006, 8(3):212-4.
- Cui, H., Niemitz, E.L., Ravenel, J.D., Onyango, P., Brandenburg, S., Lobanenko, V.V., Feinberg, A.P. „Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms' tumor commonly involves altered methylation but not mutations of CTCF or its binding site.“ *Cancer Res.*, 2001, 61(13):4947-50.
- Dammann, G., Teschler, S., Haag, T., Altmüller, F., Tuczec, F., Dammann, R.H. „Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder.“ *Epigenetics.*, 2011, 6(12):1454-62.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Seidel, C., Strunnikova, M., Rastetter, M., Baier, K., Pfeifer, G.P. „The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update.“ *Histol Histopathol*, 2005a, 20(2):645-63.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Seidel, C., Trümpler, C., Hoang-Vu, C., Gimm, O., Dralle, H., Pfeifer, G.P., Brauckhoff, M. „Frequent promoter methylation of tumor-related genes in sporadic and men2-associated pheochromocytomas.“ *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2005b, 113(1):1-7.
- Dammann, R., Strunnikova, M., Schagdarsurengin, U., Rastetter, M., Papritz, M., Hattenhorst, U.E., Hofmann, H.S., Silber, R.E., Burdach, S., Hansen, G. „CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma.“ *Eur J Cancer*, 2005c, 41(8):1223-36.
- Dammann, R., Takahashi, T., Pfeifer, G.P. „The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas.“ *Oncogene*, 2001a, 20(27):3563-7.
- Dammann, R., Yang, G., Pfeifer, G.P. „Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers.“ *Cancer Res.*, 2001b, 61(7):3105-9.

- Dammann, R.H., Kirsch, S., Schagdarsurengin, U., Dansranjav, T., Gradhand, E., Schmitt, W.D., Hauptmann, S. „Frequent aberrant methylation of the imprinted IGF2/H19 locus and LINE1 hypomethylation in ovarian carcinoma.“ *Int J Oncol.*, 2010, 36(1):171-9.
- D'Arcy, V., Pore, N., Docquier, F., Abdullaev, Z.K., Chernukhin, I., *et al.* „BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours.“ *Br J Cancer*, 2008, 98(3):571-9.
- Davalos-Salas, M., Furlan-Magaril, M., Gonzales-Buendia, E., Valdes-Quezada, C., Ayala-Ortega, E., Recillas-Targa, F. „Gain of DNA-methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human retinoblastoma gene promoter.“ *BMC cancer*, 2011, 11:232.
- Dayeh, T.A., Olsson, A.H., Volkov, P., Almgren, P., Rönn, T., Ling, C. „Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets.“ *Diabetologia*, 2013, 56(5):1036-46.
- De La Rosa-Velázquez, I.A., Rincón-Arango, H., Benitez-Brisbiesca, L. „Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF.“ *Cancer Res*, 2007, 67 (7): 2577-85.
- Demircan, B., Dyer, L.M., Gerace, M., Lobenhofer, E.K., Robertson, K.D., Brown, K.D. „Comparative epigenomics of human and mouse mammary tumors.“ *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(1):83-97.
- Dienstbach, S. „Identifizierung der CTCFL-Bindestellen in NIH3T3-Zellen und Einfluss der CTCFL-Expression auf die globale Genexpression.“ *Dissertation*, Uni Gießen, 2012.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T. „RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.“ *Genes Dev*, 2001, 15(2):188-200.
- El-Kady, A., Klenova, E. „Regulation of the transcription factor, CTCF, by phosphorylation with protein kinase CK2. FEBS Lett.“ 2005, 579(6):1424-34.
- Engel, N., Thorvaldsen, J.L., Bartolomei, M.S. „CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus.“ *Hum Mol. Genet*, 2006, 15(19):2945-54.
- Farrar, D., Rai, S., Chernukhin, I., Jagodic, M., Ito, Y., Yammine, S., Ohlsson, R., Murrell, A., Klenova, E. „Mutational analysis of the poly(ADP-ribosylation) sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosylation).“ *Mol Cell Biol*, 2010, 30 (5):1199-216.
- Feinberg, A.P., Tycko, B. „The history of cancer epigenetics.“ *Nat Rev Cancer*, 2004, 4 (2):143-53.
- Feldmann, A., Ivanek, R., Murr, R., Gaidatzis, D., Burger, L. „Transcription factor occupancy can mediate active turnover of DNA methylation at regulatory regions.“ *Plos Genetics*, 2013, 9(12):e1003994.
- Filippova, G.N. „Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF.“ *Curr Top Dev Biol*, 2008, 80: 337-360.

- Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., Lobanenko, V.V. „An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes.“ *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6):2802-13.
- Filippova, G.N., Qi, C.F., Ulmer, J.E., Moore, J.M., Ward, M.D., Hu, Y.J., Loukinov, D.I., Pugacheva, E.M., Klenova, E.M., Grundy, P.E., Feinberg, A.P., Cleton-Jansen, A.M., Moerland, E.W., Cornelisse, C.J., Suzuki, H., Komiya, A., Lindblom, A., *et al.* „Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity.“ *Cancer Res*, 2002, 62(1): 48-52.
- Fiorentino, F.P., Giordano, A. „The tumor suppressor role of CTCF.“ *Journal of cellular physiology*, 2012, 227(2):479-92.
- Frauer, C., Hoffmann, T., Bultmann, S., Casa, V., Cardoso, M.C., Antes, I., Leonhardt, H. „Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain.“ *PLoS One*, 2011, 6(6):e21306.
- Fu, Y., Sinha, M., Peterson, C.L., Weng, Z. „The insulator binding protein CTCF positions 20 nucleosomes around its binding sites across the human genome.“ *PLoS Genet*, 2008, 4(7):e1000138
- Galm, O., Herman, J.G., Baylin, S.B. „The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies.“ *Blood Rev.*, 2006, 20(1):1-13.
- Gaozza, E., Baker, S.J., Vora, R.K. *et al.* „AATYK: a novel tyrosine kinase induced during growth arrest and apoptosis of myeloid cells.“ *Oncogene*, 1997, 15(25): 3127–35.
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M. „CpG islands in vertebrate genomes.“ *J Mol Biol*, 1987, 196(2):261-82.
- Givant-Horwitz, V., Davidson, B., Goderstad, J.M., Nesland, J.M., Tropé, C.G., Reich, R. „The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma.“ *Gynecol Oncol*, 2004, 93(2):517-23.
- Globisch, D., Munzel, M., Muller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S. „Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates.“ *PLoS ONE*, 2010, 5(12):e15367.
- Gobert, R.P., Joubert, L., Curchod, M.L., Salvat, C., Foucalt, I. *et al.* „Convergent functional genomics of oligodendrocyte differentiation identifies multiple autoinhibitory signaling circuits.“ *Mol Cell Biol*, 2009, 29(6):1538–53.
- Gum, R.J., Gaede, L.L., Heindel, M.A., Waring, J.F., Trevillyan, J.M., Zinker, B.A. *et al.* „Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice.“ *Mol Endocrinol*, 2003, 17(6):1131-43.
- Haag, T. „Epigenetische Regulation von Borderline-Syndrom relevanten Genen.“, *Masterarbeit*, Uni Giessen, 2010.

- Haffner, M.C., Chaux, A., Meeker, A.K., Esopi, D.M., Gerber, J., *et al.* „Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers.“ *Oncotarget*, 2011, 2(8):627-37.
- Helmbold, P., Lahtz, C., Enk, A., Herrmann-Trost, P., Marsch, W.Ch., Kutzner, H., Dammann, R.H. „Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma.“ *Mol Carcinog.*, 2009, 48(10):903-9.
- Hesson, B., Wilson, R., Morton, D., Adams, C., Walker, M., Maher, E.R., Latif, F. „CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations.“ *Oncogene*, 2005, 24(24):3987–94.
- Hesson, L., Dallol, A., Minna, J.D., Maher, E.R., Latif, F. „NORE1A, a homologue of RASSF1A tumour suppressor gene is inactivated in human cancers.“ *Oncogene*, 2003, 22(6):947-54.
- Hodgson, N.C. „Merkel cell carcinoma: Changing incidence trends.“ *J. Surg. Oncol.*, 2005, 89(1):1-4.
- Hong, J.A., Kang, Y., Abdullaev, Z., Flanagan, P.T., Pack, S.D., Fischette, M.R., Adnani, M.T., Loukinov, D.I., Vatolin, S., Risinger, J.I., Custer, M., Chen, G.A., Zhao, M., Nguyen, D.M., Barrett, J.C., Lobanenko, V.V., Schump, D.S. „Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells.“ *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7763-74.
- <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Clara+cell>.
- http://www.ngfn.de/de/international_cancer_genome_consortium_.html. 2014.
- Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., Zhang, Y. „Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification.“ *Nature*, 2010, 466(7310):1129-33.
- Jelinic, P., Stehle, J.C., Shaw, P. „The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation.“ *PLoS Biol*, 2006, 4(11):e355.
- Jones, P. A., Baylin, S. B. „The epigenomics of cancer.“ *Cell*, 2007, 128(4):683-92.
- Jones, P., Taylor, S., Wilson, V. „DNA methylation and cancer.“ *Recent Results Cancer Res*, 1983, 84: 202-11.
- Katagiri, K., Ohnishi, N., Kabashima, K., Iyoda, T., Takeda, N., Shinkai, Y., Inaba, K., Kinashi, T. „Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking.“ *Nat. Immunol*, 2004, 5(10):1045-51.
- Kessel, P. „Funktionelle Bedeutung der UDP-N-Acetylglukosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) für die Anoikis von Tumorzellen.“ *Dissertation*. Uni Berlin, 2010.

- Kim, S.C., Hahn, J.S., Min, Y.H., Yoo, N.C., Ko, Y.W., Lee, W.J. „Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1.“ *Blood*, 1999, 93(11):3893–99.
- Kitchen, N.S., Schoenherr, C.J. „Sumoylation modulates a domain in CTCF that activates transcription and decondenses chromatin.“ *Journal of cellular biochemistry*, 2010, 111(3):665-675.
- Klenova, E. M., Morse, H. C., Ohlsson, R., Lobanenko, V.V. „The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer.“ *SeminCancer Biol*, 2002, 12(5):399-414.
- Klenova, E.M., Chernukhin, I.V., El-Kady, A., Lee, R.E., Pugacheva, E.M., Loukinov, D.I., Goodwin, G.H., Delgado, D., Filippova, G.N., Leon, J., Morse, H.C., Neiman, P.E., Lobanenko, V.V. „Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF.“ *Mol Cell Biol*, 2001, 21(6): 2221-34.
- Klenova, E.M., Nicolas, R.H., U, S., Carne, A.F., Lee, R.E., Lobanenko, V.V., Goodwin, G.H. „Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene.“ *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(3):466-74.
- Knippers, R. *Molekulare Genetik*. Bd. 9. Auflage., Thieme, 2006.
- Knudson, A.G. „Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68(4):820-3.
- Kriaucionis, S., Heintz, N. „The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.“ *Science*, 2009, 324(5929):929-30.
- Laemmli, U. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature*, 1970: 227(5259):680-5.
- Lee, S., Bang, S., Song, K., Lee, I. „Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon.“ *Oncology Reports*, 2006:16(4):747-54.
- Lehmann, U. „Pyrosequenzierung: Quantitative DNA-Methylierungsanalyse mittels Pyrosequenzierung“. Bd. 14., *Biospektrum*, 2008.
- Li, T., Chen, H., Li, W., Cui, J., Wang, G., Hu, X., Hoffman, A.R., Hu, J. „Promoter histone H3K27 methylation in the control of IGF2 imprinting in human tumor cell lines.“ *Hum Mol Genet*, 2013, 23(1):117-28.
- Li, W., Liu, M. „Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in different human tissues.“ *Journal of Nucleic Acids*, 2011, 2011: 870726.
- Lian, C.G., Xu, Y., Ceol, C., Wu, F., Larson, A., et al. „Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma.“ *Cell*, 2012, 150(6):1135-46.

- Lin, S.C., Chien, C.W., Lee, J.C., Yeh, Y.C., Hsu, K.F., Lai, Y.Y. *et al.* „Suppression of dual specificity phosphatase-2 by hypoxia increases chemoresistance and malignancy in human cancer cells.“ *J Clin Invest*, 2011, 121(5):1905-16.
- Liu, C., Liu, L., Chen, X., Shen, J., Shan, J., Xu, Y., Yang, Z., Wu, L., Xia, F., Bie, P., Cui, Y., Bian, X., Qian, C. „Decrease of 5-hydroxymethylcytosin is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1.“ *PLOS ONE*, 2013, 8(5):e62828.
- Lobanenkov, V.V., Nicolas, R.H., Adler, V.V., Paterson, H., Klenova, E.M., Polotskaja, A.V., Goodwin, G.H. „A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene.“ *Oncogene*, 1990, 5(12):1743-53.
- Loenen, W. A. „S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of every-thing?“ *Biochem Soc Trans*, 2006:34(Pt 2):330-3.
- Lottspeich, F., Engels, J. W. *Bioanalytik*. Bd. 2. Auflage. Elsevier, 2006.
- Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S.D., Moon, H., Chernukhin, I., Mannan, P., Larsson, E., Kanduri, C., Vostrov, A.A., Cui, H., Niemitz, E.L., Rasko, J.E., Docquier, F.M., Kistler, M., Breen, J.J., Zhuang, Z., Quitschke, W.W., Renkawitz, R. „BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002: 99(10):6806-11.
- Lutz, M., Burke, L.J., Barreto, G., Goeman, F., Greb, H., Arnold, R., Schultheiss, H., Brehm, A., Kouzarides, T., Lobanenkov, V., Renkawitz, R. „Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases.“ *Nucleic Acids Res*, 2000: 28(8):1707-13.
- Ma, S., Rubin, B. P. „Apoptosis-associated tyrosine kinase 1 inhibits growth and migration and promotes apoptosis in melanoma.“ *Laboratory Investigation*, 2014, 94(4):1-9.
- Macheiner, D., Heller, G., Kappel, S., Bichler, C., Stattner, S., Ziegler, B., Kandioler, D., Wrba, F., Schulte-Hermann, R., Zochbauer-Muller, S. *et al.* „NORE1B, a candidate tumor suppressor, is epigenetically silenced in human hepatocellular carcinoma.“ *J. Hepatol.*, 2006, 45(1):81-9.
- MacPherson, M.J., Beatty, L.G., Zhou, W., Du, M. and Sadowski, P.D. „The CTCF insulator protein is posttranslationally modified by SUMO.“ *Mol Cell Biol*, 2009, 29(3):714-25.
- Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., Heintz, N. „MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system.“ *Cell* 2012, 2012,151(7):1417-30
- Méndelez-Catalá, C.F., Gretton, S., Vostrov, A., Pugacheva, E., Farrar, D., Ito, Y., Docquier, F., Kita, G.X., Murrell, A., Lobanenkov, V., Klenova, E. „A novel mechanism for CTCF in the epigenetic regulation of Bax in breast cancer cells.“ *Neoplasia*, 2013, 15(8): 898-912.

- Moshnikova, A., Frye, J., Shay, J.W., Minna, J.D., Khokhlatchev, A.V. „The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway.“ *J. Biol. Chem*, 2006, 281(12):8143–52.
- Nakagawa, H., Chadwick, R.B., Peltomaki, P., Plass, C., Nakamura, Y., de La Chapelle, A. „Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, 98(2):591-6.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A. „Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.“ *Nature*, 1998, 393(6683):386-9.
- Neri, F., Incarnato, D., Krepelova, A., Rapelli, S., Pagnani, A., Zecchina, R., Parlato, C., Oliviero, S. „Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells.“ *Genome biology*, 2013,14(8):R91.
- Nestor, C. E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D.,Dunican, D., Katz, E., Dixon, J. M., Harrison, D. J., Meehan, R. R. „Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes.“ *Genome Res.*, 2011: 22(3):467-77.
- Nguyen, P., Bar-Sela, G., Sun, L., Bisht, K.S., Cui, H., Kohn, E., Feinberg, A.P., Guis, D. „BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression.“ *Mol Cell Biol*, 2008a, 28(21):6720-629.
- Nguyen, P., Cui, H., Bisht, K.S., Sun, L., Patel, K., Lee, R.S., Kugoh, H., Oshimura, M., Feinberg, A.P. and Gius, D. „CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region.“ *Cancer Res*, 2008b: 68(14):5546-51
- Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Yu, X., Cheng, L., Schuebel, K.E., Cope, L., Mohammad, H.P., Chen, W., Daniel, V.C., Yu, W., Berman, D.M., Jenuwein, T., Pruitt, K., Sharkis, S.J., Watkins, D.N., Herman, J.G., Baylin, S.B. „A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing.“ *Nat Genet*, 2007, 39(2):237-42
- Okami, N., Narasimhan, P., Yoshioka, H., Sakata, H., Kim, G.S., Jung, J.E., Maier, C.M., Chan, P.H. „Prevention of JNK phosphorylation as a mechanism for rosiglitazone in neuroprotection after transient cerebral ischemia.“ *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013: 33(1):106-14
- Pant, V., Kurukuti, S., Pugacheva, E., Shamsuddin, S., Mariano, P., Renkawitz, R., Klenova, E., Lobanenko, V., Ohlsson, R. „Mutation of a single CTCF target site within the H19 imprinting control region leads to loss of Igf2 imprinting and complex patterns of de novo methylation upon maternal inheritance.“ *Mol Cell Biol*, 2004, 24(8):3497-504.
- Paprotka, C. „Analyse des durch den Isolationsfaktor CTCF vermittelten Einfluss auf Chromatin.“ *Dissertation*. Uni Gießen. 2010.

- Pastor, W.A., Aravind, L., Rao, A. „TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription.“ *Nature reviews Molecular cell biology*, 2013, 14(6):341-56.
- Patterson, K.I., Brummer, T., O' Brien, P.M., DALY, R.J. „Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets.“ *Biochem. J.*, 2009, 418(3):475-89.
- Penn, N. W., Suwalski, R., O'Riley, C., Bojanowski, K., Yura, R. „The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid.“ *Biochem. J.*, 1972, 126(4):781-90.
- Pfeifer, G.P., Kadam, S., Jin, S.G. „5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer.“ *Epigenetics & Chromatin*, 2013, 6(1):10.
- Raghunath, M., Patti, R., Bannerman, P. *et al.* „A novel kinase, AATYK induces and promotes neuronal differentiation in a human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line.“ *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 77(2):151-62
- Renaud, S., Loukinov, D., Bosman, F.T., Lobanenko, V., Benhattar, J. „CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription.“ *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(21):6850-60.
- Renaud, S., Pugacheva, E.M., Delgado, M.D., Braunschweig, R., Abdullaev, Z., Loukinov, D., Benhattar, J., Lobanenko, V. „Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors.“ *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(21):7372-88.
- Richter, A.M., Haag, T., Walesch, S., Herrmann-Trost, P., Marsch, W.C., Kutzner, H., Helmbold, P., Dammann, R.H. „Aberrant Promoter Hypermethylation of RASSF Family Members in Merkel Cell Carcinoma“. *Cancers (Basel)*, 2013, 5(4):1566-76.
- Richter, A.M., Pfeiffer, G.P., Dammann, R.H. „The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization.“ *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1796(2):114-28.
- Richter, A.M., Walesch, S.K., Würfl, P., Taubert, H., Dammann, R.H. „The tumor suppressor RASSF10 is upregulated upon contact inhibition and frequently epigenetically silenced in cancer.“ *Oncogenesis*, 2012, 1(6):e18.
- Ríos, P., Nunes-Xavier, C.E., Tabernero, L., Köhn, M., Pulido, R. „Dual-Specificity Phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease.“ *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 2014, 20(14):2251-73.
- Rohan, P.J., Davis, P., Moskaluk, C.A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U. *et al.* „Pac1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase.“ *Science*, 1993, 259(5102):1763-66.
- Roth, S. „Untersuchungen zu Struktur und Funktion Ca²⁺-aktivierter Kaliumkanäle und ihrer Verwendung im Hochdurchsatz-Screening.“ *Dissertation*. Universität Frankfurt, 2006.
- Rothhämel, S., Jahnson, M. „Gentechnische Methoden“. *Springer Verlag*, 2012.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, R., Erlich, H. A. „Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase.“ *Science*, 1988, 239(4839):487-91.
- Saito, H., Inazawa, J., Saito, S., Kasumi, F., Koi, S., Sagae, S., Kudo, R., Saito, J., Noda, K., Nakamura, Y. „Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors.“ *Cancer Res*, 1993, 53(14):3382-5.
- Sano, H., Wada, S., Eguchi, H., Osaki, A., Saeki, T., Nishiyama, M. „Quantitative prediction of tumor response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: novel marker genes and prediction model using the expression levels.“ *Breast Cancer*, 2012, 19(1):37-45.
- Schagdarsurengin U., Richter A.M., Wöhler C., Dammann R.H. „Frequent epigenetic inactivation of RASSF10 in thyroid cancer.“ *Epigenetics*, 2009, 4(8):571-6.
- Schagdarsurengin, U., Richter, A.M., Hornung, J., Lange, C., Steinmann, K., Dammann, R.H. „Frequent epigenetic inactivation of RASSF2 in thyroid cancer and functional consequences.“ *Mol. Cancer*, 2010, 9:264.
- Shapiro, R., Braverman, B., Louis, J. B., Servis, R. E. „Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite.“ *J Biol Chem.*, 1973, 248(11):4060-4.
- Shih le, M., Wang, C.C., Gu, J., Davidson, B., Cope, L., Kurman, R.J., Xuan, J., Wang, T.L. „Distinct DNA methylation profiles in ovarian serous neoplasms and their implications in ovarian carcinogenesis.“ *AM J Obstet Gynecol*, 2010, 203(6):e581-522.
- Sleutels, F., Soochit, W., Bartkuhn, M., Heath, H., Dienstbach, S., Bergmaier, P., Franke, V., Rosa-Garrido, M., van de Nobelen, S., Caesar, L., van der Reijden, M., Bryne, C. *et al.* „The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner.“ *Epigenetics & Chromatin*, 2012, 5(1):8
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C. H., Zhang, W., Jian, X. *et al.* „Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine.“ *Nat. Biotechnol.*, 2011, 29(1):68-72.
- Soto-Reyes, E., Recillas-Targa, F. „Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines.“ *Oncogene*, 2010, 29(15): 2217-27.
- Splinter, E., Heath, H., Kooren, J., Palstra, R., Kloous, P., Grodvel, F., Galjart, N., de Laat, W. „CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus.“ *Genes Dev*, 2006, 20(17):2349-54.
- Stadler, M.B., Murr, R., Burger, L., Ivanek, R., Lienert, F., Scholer, A., van Nimwegen, E., Wirbelauer, C., Oakeley, E.J., Gaidatzis, D., *et al.* „DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions.“ *Nature*, 2011, 480(7378):490-5.
- Streng, D. *Masterarbeit*, Uni Giessen, 2012.

- Sui, X., Price, C., Li, Z., Chen, J. „Crosstalk Between DNA and Histones: Tet's New Role in Embryonic Stem Cells.“ *Current genomics*, 2012,13(8):603-8.
- Sun, L., Huang, L., Nguyen, P., Bisht, K.S., Bar-Sela, G., Ho, A.S., Bradbury, C.M., Yu, W., Cui, H., Lee, S., Trepel, J.B., Feinberg, A.P., Gius, D. „DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation.“ *Cancer Res*, 2008, 68(8):2726-35.
- Suzuki, M. M., Bird, A. „DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics.“ *Nat. Rev. Genet.*, 2008, 9(6):465-764.
- Suzuki, M., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Sakurai, T., Oikawa, T. „Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression.“ *Oncogene*, 2003, 22(54):8688-98.
- Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C. S., Spada, F. & Leonhardt, H. „Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA.“ *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38(19):e181.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L. *et al.* „Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner Tet1.“ *Science*, 2009, 324(5929):930-5.
- Takai, D., Gonzales, F.A., Tsai, Y.C., Thayer, M.J., Jones, P.A. „Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer.“ *Hum Mol Gent*, 2001, 10(23):2619-26.
- Takano T, *et al.* „LMTK1/AATYK1 is a novel regulator of axonal outgrowth that acts via Rab11 in a Cdk5-dependent manner.“ *J Neurosci.*, 2012, 32(19):6587-99.
- Thiriet, N., Humblot, N., Burgun, C., Aunis, D., Zwiller, J. „Cocaine and fluoxetine induce the expression of the hVH-5 gene encoding a MAP kinase phosphatase.“ *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 62(2):150-7.
- Tiffen, J.C., Bailey, C.G., Marshall, A.D., Metierre, C., Feng, Y., Wang, Q., Watson, S.L., Holst, J., Rasko, J.E. „The cancer-testis antigen BORIS phenocopies the tumor suppressor CTCF in normal and neoplastic cells.“ *Int J Cancer*, 2013, 133(7):1603-13.
- Tommasi, S., Dammann, R., Jin, S.G., Zhang, X.F., Avruch, J., Pfeifer, G.P. „RASSF3 and NORE1: Identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1.“ *Oncogene*, 2002, 21(17):2713-20
- Tomomura, M., Hasegawa, Y., Hashikawa, T. *et al.* „Differential expression and function of apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK).“ *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 112(1-2):103-12.
- Tomomura, M., Morita, N., Yoshikawa, F. *et al.* „Structural and functional analysis of the apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) family.“ *Neuroscience*, 2007, 148(2):510-21.

- Torrano, V., Navascues, J., Docquier, F., Zhang, R., Burke, L.J., Chernukhin, I., Farrar, D., Leon, J., Berciano, M.T., Renkawitz, R., Klenova, E., Lafarga, M., Delgado, M.D. „Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism.“ *J Cell Sc*, 2006, 119(Pt 9):1746-59.
- Touleimat, N., Tost, J. „Complete pipeline for Infinium Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation.“ *Epigenomics*, 2012, 4(3):325-41.
- Turner-Ivey, B., Manevich, Y., Schulte, J., Kistner-Griffin, E., Jezierska-Drutel, A., Liu, Y., Neumann, C.A. „Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer.“ *Oncogene*, 2013, 32(45):5302-14.
- van der Weyden, L., Adams, D.J. „The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis.“ *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776(1):58-85.
- Van Gele, M., Kaghad, M., Leonard, J. H., van Roy, N., Naeyaert, J. M., Geerts, M. L., van Belle, S. *et al.* „Mutation analysis of p37 and TP53 in merkel cell carcinoma.“ *Br. J. Cancer*, 2000, 82:823-826.
- Vatolin, S., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Flanagan, P.T., Custer, M., Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Hong, J.A., Morse, H., Schrupp, D.S., Risinger, J.I., Barrett, J.C., Lobanenko, V.V. „Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes.“ *Cancer Res*, 2005, 65(17):7751-62.
- Viswanathan, M., Sangiliyandi, G., Vinod, S.S., Mohanprasad, B.K., Shanmugam, G. „Genomic instability and tumor-specific alterations in oral squamous cell carcinomas assessed by inter-(simple sequence repeat) PCR.“ *Clin Cancer Res*, 2003, 9(3):1057-62.
- Vos, M.D., Martinez, A., Ellis, C.A., Vallecorsa, T., Clark, G.J. „The pro-apoptotic Ras effector Nore1 may serve as a Ras-regulated tumor suppressor in the lung.“ *J. Biol. Chem*, 2003, 278(24):21938-43.
- Vostrov, A.A., Quitschke, W.W. „The zinc finger protein CTCF binds to the APBbeta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation.“ *J Biol Chem*, 1997, 272(52):33353-9.
- Ward, Y., Gupta, S., Jensen, .P, Wartmann, M., Davis, R.J., Kelly, K. „Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1.“ *Nature*, 1994, 367(6464):651-4.
- Weber, M., Schübeler, D. „Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) (PROT33). The Epigenome, Network of Excellence, 2007
- Wei, W., Jiao, Y., Postlethwaite, A., Stuart, J.M., Wang, Y., Sun, D., Gu, W. „Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases.“ *Genes and Immunity*, 2013, 14(1):1-6.
- Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., Yahata, K., Imamoto, F., Aburatani, H., Nakao,

- M., Imamoto, N., Maeshima, K., Shirahige, K., Peters, J.M. „Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor.“ *Nature*, 2008, 451(7180):796-801.
- Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D.J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., Laird, P.W. „Epigenetic stem cell signature in cancer.“ *Nat Genet*, 2007, 39(2):157-8.
- Williams, A., Flavell, R.A. „The role of CTCF in regulating nuclear organization.“ *J Exp Med* 2008, 205(4):747-50.
- Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M.T., Johansen, J.V., Cloos, P.A., Rappsilber, J., Helin, K. „TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity.“ *Nature*, 2011, 473(7347):343-8.
- Witcher, M., Emerson, B.M. „Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary.“ *Mol Cell*, 2009, 34(3):271-84.
- Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y.E., Zhang, Y. „Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells.“ *Nature*, 2011, 473(7347):389-93.
- Wu, H., Zhang, Y. „Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation.“ *Genes Dev*, 2011, 25(23):2436-52.
- Wu, J., Jin, Y.J., Calaf, G.M., Huang, W.L., Yin, Y. „PAC1 is a direct transcription target of E2F-1 in apoptotic signaling.“ *Oncogene* , 2007, 26(45):6526-35.
- www.genecards.org.
- www.phe-culturecollections.org.
- www.pschyrembel.de.
- Wyatt, G. R. & Cohen, S. S. „The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine.“ *Biochem. J.* ,1953, 55(5):774-82.
- Xu, J., Huo, D., Chen, Y., Nwachukwu, C., Collins, C., Rowell, J., Slamon, D., Olopade, O. „CpG island methylation affects accessibility of the proximal BRCA1 promoter to transcription factors.“ *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 120(3):593-601.
- Yang, H., Liu, F., Bai, F., Zhang, J.Y., Ma, S.H., *et al.* „Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation.“ *Oncogene*, 2013, 32(5):663-669.
- Yildirim, O., Li, R., Hung, J.H., Chen, P.B., Dong, X., Ee, L.S., Weng, Z., Rando, O.J., Fazio, T.G. „Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells.“ *Cell*, 2011, 147(7):1498-510.

- Yin, Y., Liu, Y.X., Jin, Y.J., Hall, E.J., Barrett, J.C. „PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression.“ *Nature*, 2003, 422(6931):527-31.
- Yu, J., Zhou, H., Jin, Y., Bai, J., Yu, Y., Geng, J., Qi, J., Fu, S. „Three distinct regions of allelic deletion on chromosome 17 involved in sporadic gastric cancer.“ *Hepatogastroenterology*, 2008, 55(85):1487-91.
- Yu, M., Hon, G., Szulwach, K., Song, C., Zhang, L., Kim, A., Li, X., Dai, Q., Shen, Y., Park, B., Min, J., Jin, P., Ren, B., He, C. „Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine in the Mammalian Genome.“ *Cell*, 2012, 149(6):1368-80.
- Yu, W., Ginjala, V., Pant, V., Chernukhin, I., Whitehead, J., Docquier, F., Farrar, D., Tavoosidana, G., Mukhopadhyay, R., Kanduri, C., Oshimura, M., Feinberg, A.P., Lobanenko, V., Klenova, E., Ohlsson, R. „Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation.“ *Nat Genet*, 2004, 36(10):1105-10.
- Yu, Y.P., Paranjpe, S., Nelson, J., Finkelstein, S., Ren, B., Kokkinakis, D., Michalopoulos, G., Luo, J.H. „High throughput screening of methylation status of genes in prostate cancer using an oligonucleotide methylation array.“ *Carcinogenesis*, 2005, 26(2):471-9.
- Yusufzai, T.M., Tagami, H., Nakatani, Y., Felsenfeld, G. „CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species.“ *Mol Cell*, 2004, 13(2):291-8.
- Zhang H, Niu, B., Hu, J.F., Ge, S., Wang, H., Li, T., Ling, J., Steelman, B.N., Qian, G., Hoffman, A.R. „Interruption of intrachromosomal looping by CCCTC binding factor decoy proteins abrogates genomic imprinting of human insulin-like growth factor II.“ *The Journal of cell biology*, 2011, 193(3):475-87.
- Zhang, Y., Blattman, J.N., Kennedy, N.J., Duong, J., Nguyen, T., Wang, Y., Davis, R.J., Greenberg, P.D., Flavell, R.A., Dong, C. „Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5.“ *Nature*, 2004, 430(7001):793-7.
- Zhang, R., Burke, L.J., Rasko, J.E., Lobanenko, V., Renkawitz, R. „Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody.“ *Exp Cell Res*, 2004, 294(1):86-93.
- zur Hausen, H., Gissmann, L., Steiner, W., Dippold, W., Dreger, I. „Human papilloma viruses and cancer.“ *Bibl Haematol*, 1975, 193:569-71.

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort / Datum

Tanja Haag

9 Danksagung

Zu guter Letzt ein Dank an diejenigen, ohne die die Fertigstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Dammann dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, Teil seiner Arbeitsgruppe gewesen zu sein. Vielen Dank für die Geduld, Hilfsbereitschaft und das große Verständnis für schwierige Situationen im Leben.

Ein weiterer riesengroßer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und ohne die das vorrangegangene Studium erst gar nicht möglich gewesen wäre und die Promotion erst recht nicht. Vielen Dank, dass ihr meine oftmals schlechte Laune so tapfer ertragen habt. Dir Papa danke ich zudem für das Ausbügeln der Komma- und Rechtschreibfehler in der Diss.

Das gleiche gilt für Sören, der oft die volle Packung miese Laune abbekommen hat, wenn mal wieder die nicht funktionierenden Experimente mich an den Rande des Wahnsinns getrieben haben. Danke, dass du in schwierigen Lebensphasen da warst und mich immer wieder versucht hast aufzubauen, mir Mut gemacht und Kraft gegeben hast. Du hast ganz schön was mitgemacht. Danke!!!

Es mag ungewöhnlich sein und so mancher wird mich für verrückt erklären, aber auch bei meinen Katzen Barnaby, Lucy und Muun (Felix hat das Ende der Diss leider nicht mehr mitbekommen) möchte ich mich bedanken. Einfach dafür, dass sie da waren, wenn ich nach Hause gekommen bin. Man kann noch so schlechte Laune haben, wenn die Katzen Einen anschauen und um die Beine streichen, verfliegt sie. Lucy gilt ein ganz besonderer Dank. Der kleine, freche Sonnenschein hat mir gezeigt, dass man auch in scheinbar aussichtslosen Situationen nicht aufgeben darf und weiter kämpfen muss. Manchmal lohnt es sich doch.

Wo wir gerade bei der Familie sind. Einen ganz lieben Dank auch an meine Oma Magda. Auch sie war immer für mich da und hat mich gerade während der Schreibphase mit leckerem Mittagessen versorgt.

Nun zu den Kollegen. Allen danke ich für das wirklich gute Arbeitsklima in der AG Dammann.

Zwischendrin mal ein Schwätzchen mit Steffi halten macht den Laboralltag einfach viel erträglicher und lustiger. Ich hab dich in der Zeit zum Schluss hin wirklich vermisst. Diese Stille! Schrecklich! Danke auch an Steffen, mit dem es sich immer gut lästern lies. Wir Siegerländer müssen doch zusammenhalten. Ebenfalls danke ich Antje für ihre fachliche Kompetenz und Hilfsbereitschaft. Ohne sie wäre ich so manches Mal aufgeschmissen gewesen. Aber nicht nur fachlich danke ich ihr, sondern auch für die vielen essentiell wichtigen Katzengespräche. Ja. Man kommt schneller zu einem Stubentiger, als man denkt. Nicht wahr, Antje? Auch Adrianna gilt ein besonderer Dank. Wenn Adri, der Sonnenschein dich anlacht, kannst du gar nicht mehr Grumpy Cat like sein. Auch Sara und Daniela danke ich an dieser Stelle, sowohl für die Arbeit und Hilfe im Labor, als auch die netten Gespräche fernab von Labor & Arbeit. Ein weiterer großer Dank gilt den ehemaligen Masterstudenten, vor allem Tina und Martin, die viel zu dem Projekt beigetragen haben. Ohne den Bioinformatik-Profi Martin, hätte ich nicht so schöne Abbildungen der 450K Array-Daten in

der Arbeit und hätte die qRTs nicht mehr auswerten können. Danke! Aber nicht nur, was die Computersachen angeht, danke ich dir. Du hast auch versucht, mich aufzubauen und zu helfen, dass ich nicht immer alles tief schwarz sehe. Bleib so, wie du bist. Auch der AG-Renkawitz danke ich, insbesondere denen, die mir mit Vektoren...oder bioinformatischer Auswertung (Marek) weitergeholfen haben. Zu guter Letzt gilt mein Dank denjenigen, die ich jetzt gerade vergessen habe zu erwähnen.